

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Mauricio Peña Cunha

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DA  
CREATINA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia S. Rodrigues

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cunha, Mauricio Peña  
EFEITO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DA CREATINA /  
Mauricio Peña Cunha ; orientadora, Ana Lúcia Severo  
Rodrigues - Florianópolis, SC, 2013.  
319 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências.

Inclui referências


1. Neurociências. 2. Antidepressivo. 3. Neuroproteção.  
4. Creatina. 5. 6-OHDA. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências. III. Título.

**MAURÍCIO PEÑA CUNHA**


**“EFEITO ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DA  
CREATINA”.**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade  
Federal de Santa Catarina

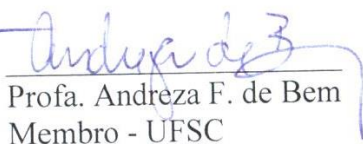
Florianópolis, 14 de junho de 2013.

  
Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues  
Coordenadora do Curso

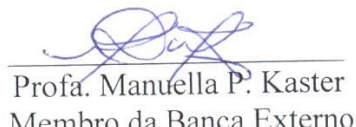
Banca Examinadora:


  
Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues  
Orientadora – UFSC

  
Prof. Adair R. S. dos Santos  
Membro - UFSC

  
Profa. Andreza F. de Bem  
Membro - UFSC

  
Prof. Luiz Fernando F. Royes  
Membro da Banca Externo

  
Profa. Manuella P. Kaster  
Membro da Banca Externo

  
Prof. Rui Daniel Schröder Prediger  
Membro - UFSC



Dedico esta tese a todas as pessoas que acreditaram no meu esforço e sonhos, compartilhando momentos de alegria e momentos difíceis ao meu lado. Vocês me tornaram um homem mais realizado.



## AGRADECIMENTOS

Eu, ao longo de sete anos na Pós-Graduação em Neurociências em Florianópolis, ri, chorei, cresci e tive a oportunidade de ter ao meu lado pessoas que me ajudaram como ser humano e como pesquisador que sou hoje. E assim gostaria de agradecer individualmente a todos pelo companheirismo e amizade.

Gostaria de agradecer inicialmente à minha orientadora Ana Lúcia Severo Rodrigues pela conduta moral e profissional, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no estudo da neurobiologia da depressão, pelo grande apoio diário, por sua dedicação, pelos ensinamentos e orientação indispensáveis para meu aprendizado. Admiro seu caráter, seriedade, e sinceridade. Agradeço por todos os momentos de aprendizado que tive durante esta jornada ao seu lado. A senhora me ensinou a amar a pesquisa científica e me fez ser o pesquisador que sou hoje. Ana você é muito mais que uma professora para mim, a senhora é uma amiga que para sempre irei levar na minha memória como exemplo de pessoa e de profissional! Muito obrigado por tudo!

Agradeço à minha família pelo apoio incansável e por todo esforço que vocês fizeram por mim. Se abdicando de diversas coisas para eu poder realizar os meus sonhos. Minha mãe (Adilene Emília Peña Cunha) e meu pai (Gedeão Cunha Junior) vocês são as pessoas mais incríveis que um ser humano poderia ter como pais. Muito obrigado por todo amor que vocês sempre dispensaram para comigo e por todos os ensinamentos da vida. Amo e sempre amarei vocês!

Também agradeço ao meu irmão Marcio Moushe Peña Cunha por ser essa pessoa genial. Uma pessoa que cresceu junto comigo e que pode compartilhar diversas fases da minha vida. Muito obrigado pelo carinho e amor!

Agradeço à minha noiva Bianca Pires Quinellato pelo apoio, por acreditar em mim, e por fazer meus dias mais divertidos e alegres! Obrigado por tudo meu amor! Amo-te!

Agradeço ao meu amigo Francis L. Pazini. O Francis entrou no laboratório e logo se tornou um dos meus maiores amigos da vida. Além de toda a parceria em meus trabalhos experimentais, conversas online, bar do CTC e tantos outros momentos, você pode me ensinar muitas coisas da vida. Profissional exemplar e amigo para todas as horas! Você, meu grande amigo, é uma pessoa genial que poderá contar para sempre com a minha amizade e admiração. Obrigado por tudo mano!

Gostaria de agradecer também a minha grande amiga Àgatha Oliveira por todos os momentos de amizade, carinho e dedicação. Àgatha eu só tenho a agradecer tudo que você fez por mim. Eu admiro demais você, sua personalidade, seu jeito de ser, seu profissionalismo exemplar, seu companheirismo. Sou e sempre serei grato a você por tudo. Você sempre poderá contar com a minha amizade, meu respeito e meu carinho! Muito obrigado por tudo!

Agradeço ao meu amigo Vicente Lieberknecht por todos os momentos de amizade, carinho e respeito. “Vicent” você é um grande pesquisador e um grande ser humano. Obrigado por tudo!

Agradeço a Fabiana Ludka (Fabi) por todo carinho, amizade, alegria e profissionalismo. Fabi muito obrigado pelo seu jeito meigo, carinhoso e por todo o seu empenho profissional para comigo. Os experimentos com você sempre são divertidos.

Agradeço à amiga Daniele Guilhermano por ser um símbolo de perseverança, garra e vontade! Muito obrigado por vários momentos de alegria!

Agradeço a amiga Josiane Budni por me oportunizar momentos de alegria e diversão dentro e fora do laboratório.

Agradeço a professora Manuela García López (Universidade Autónoma de Madrid) pela hospitalidade, amizade e carinho. Muchas gracias! Besos!

Agradeço a minha amiga Maria Dolores Martín-de-Saavedra (Lola) por me apresentar Madrid, por ser minha amiga para todas as horas, minha parceira de experimento e uma pessoa indescritivelmente mágica! Muchas gracias por todo! Besos!

Gostaria de agradecer a professora Susana Rubialez (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), bem como sua aluna Marisa Gherzi por todo carinho e amizade. Besos!

Agradeço ao Juliano Capra e ao Jardel Jacinto pelas idéias, troca de conhecimento e amizade em todo esse tempo de laboratório. Futuros médicos vocês irão chegar muito longe! Grande abraço.

Agradeço a Cristiane Louise (Cris) e a Júlia Macedo por terem estado grande parte do meu trabalho me ajudando, auxiliando e trazendo alegria aos experimentos. Além da grande amizade, respeito e carinho que tenho por vocês. Desejo toda a felicidade do mundo a vocês.

Agradeço as doutoras Patrícia Brocardo e Manuella Kaster por serem grandes professoras para mim, me ensinando e ajudando em muitas fases do meu aprendizado dentro do laboratório.



Agradeço ao Luis Bettio pelas conversas diurnas no laboratório e noturnas no computador, e pelos seus questionamentos cotidianos. Você me fez crescer muito como pesquisador.

Agradeço ao André Colla por ser essa pessoa que trouxe alegria ao laboratório através do seu carisma nato. Obrigado mesmo pelas conversas, companheirismo e amizade.

Agradeço a Luana Manosso por acompanhar meus treinos da tese e me oportunizar aprendizados em relação aos alimentos que ingerimos.

Agradeço à Priscila Batista por toda a elaboração das ilustrações da tese, bem como a sua prestatividade e colaboração nas tarefas laboratoriais.

Agradeço a Camille Ribeiro por me acompanhar dos primeiros experimentos da tese até os finais. Sua prestatividade e responsabilidade contribuíram muito para este trabalho.

Ainda, agradeço a Andiara Espíndola, Camila Zanelo, Chandra Cardoso, Giordano Viola, Grasiela Balen, Kelly Ribas, Morgana Moretti, Ricardo Binfaré e Vivian Neis pelo companheirismo, respeito e convivência diária durante todo este tempo de Pós-Graduação.

Agradeço também ao meu amigo Gianni Mancini pela honestidade e amizade demonstrada em cada ato de carinho e respeito. Amigo igual a você a gente não procura, a gente reconhece. Sou eternamente grato!

Agradeço aos amigos de outros laboratórios Aderbal Aguiar (Departamento de Bioquímica), Daniel Fernandes, Leidiane Mazzardo (Centro de Ciências Fisiológicas), Viviane Aparecida Balvedi Polli (Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética), Laura del Barrio, Alejandro Romero, Javier Egea, Esther Parada, Marcos Maroto (Universidad Autonoma de Madrid)! Obrigado pessoal!

Agradeço aos docentes do curso de Pós-Graduação em Neurociências, em especial ao professor Rodrigo Bainy Leal, Nelson Gabilan, Marcelo Farina e Carla Tasca que de forma amistosa sempre tiveram a paciência de transmitir seus vastos conhecimentos e colaboraram de forma direta ou indireta para este trabalho.

Agradeço ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação, por sua colaboração incansável, e por sua amizade. Obrigado pelo apoio e incentivo por todos esses anos.

Agradeço as agências de fomento em pesquisa CAPES e CNPq por todo o período de auxílio financeiro que assim puderam transformar meus sonhos em realidade e me formar como pesquisador e ser humano. Acredito que vocês poderiam ter aumentado o valor das bolsas anteriormente, mas mesmo assim meu muito obrigado!

Agradeço aos meus grandes amigos Leandro Toscano de Carvalho (Ferrys), Filipe Matos (Fritz), Ricardo Campos que sempre foram grandes amigos e companheiros de moradia! Meus grandes amigos, eu considero vocês meus grandes irmãos! Sou e sempre serei grato por tudo que vocês fizeram por mim! Desde conversas, festas, bate papo, até lavar uma louça e limpar a casa, vocês sempre tiveram ao meu lado. Obrigado por tudo.

Agradeço a minha amiga Lausimar Soccol que me acolheu em Florianópolis com extrema virtude, carinho e amizade. Lausi muito obrigado por me fazer crer na nossa profissão e por ser essa grande pessoa que és. Só tenho a agradecer por esses 7 anos de amizade e carinho.

Agradeço aos meus grandes amigos da vida Jeffinho, Bruno e Sandro Vargas (*in memorian*) que contribuíram no meu amadurecimento pessoal e profissional! Sandrão eu sei que você seguiu um caminho de luz, mas você faz uma falta imensa meu brother.

Agradeço ainda aos meus avós maternos, Alzira Alves Peña e Artur Gregório Peña (*In Memoriam*) pelo amor transmitido. Vô, muito bom voltar a sua terra de origem (Espanha) e ter tido essa experiência indescritível que foi ter vivido em Madrid. Vózinha, saudade das nossas brincadeiras, de nossas conversas e da sua comidinha gostosa.

Agradeço também a minha avó paterna Célia Souza Cunha que pode me mostrar que a ciência pode alterar diversos transcurso ditos “inevitáveis” da doença de Alzheimer.

E por fim gostaria de agradecer aos animais experimentais, companheiros indispensáveis para o meu desenvolvimento científico e pessoal. Fica aqui registrado minha gratidão, respeito e reconhecimento! A evolução da humanidade está interligada de forma relevante as vossas existências

*A força não provém da capacidade física, e sim de  
uma vontade indomável  
(Mahatma Gandhi)*

*Se você não erra, provavelmente não está  
trabalhando em problemas suficientemente  
desafiadores. E isto sim é um grande erro  
(Frank Wilczek, Prêmio Nobel de Física em 2004)*



## RESUMO

A creatina modula a bioenergética celular e apresenta efeito antiexcitotóxico, antioxidante e apresenta propriedades neuroprotetora e antidepressiva, no entanto, os mecanismos intracelulares responsáveis por esses efeitos ainda não estão bem estabelecidos. No primeiro capítulo desta tese foi analisado o efeito da administração de creatina (p.o.) em camundongos no teste de suspensão pela cauda (TSC), um teste preditivo de atividade antidepressiva. Além disso, foi avaliado o envolvimento dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico, bem como as vias de sinalização intracelular mediadas por L-arginina/óxido nítrico (ON), proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), cinase da cinase ativada por mitógenos (MEK)/cinase ativada por estímulos extracelulares (ERK) 1/2, cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMK-2), fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K)/proteína cinase B (AKT), glicogênio sintase cinase  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e hemeoxigenase-1 (HO-1) implicadas no efeito antidepressivo da creatina no TSC. A administração de creatina (0,1-1000 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade em camundongos submetidos ao TSC, sem alterar a atividade locomotora. O efeito anti-imobilidade promovido pela administração de creatina no TSC foi bloqueado pelo pré-tratamento dos camundongos com  $\rho$ -clorofenilalanina metil éster (PCPA; 100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos, inibidor da síntese de serotonina (5-HT)),  $\alpha$ -metil- $\rho$ -tirosina (AMPT; 100 mg/kg, i.p., inibidor da enzima tirosina hidroxilase), haloperidol (0,2 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos), SCH23390 (0,05 mg/kg, s.c., antagonista de receptores dopaminérgicos  $\text{D}_1$ ), sulpirida (50 mg/kg, i.p., antagonista de receptores dopaminérgicos  $\text{D}_2$ ), prazosina (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), N-metil-D-aspartato (NMDA) (0,1 pmol/sítio, i.c.v.), D-serina (30  $\mu\text{g}$ /sítio, i.c.v., agonista do sítio da glicina do receptor NMDA), arcaína (1 mg/kg, i.p., antagonista do sítio das poliaminas dos receptores NMDA), L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursor de ON), SNAP (25  $\mu\text{g}$ /site, i.c.v, doador de ON), 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p., inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal), H-89 (1  $\mu\text{g}$ /sítio, i.c.v., inibidor de PKA), KN-62 (1  $\mu\text{g}$ /sítio, i.c.v., inibidor de CaMK-2), queleritrina (1  $\mu\text{g}$ /site, i.c.v., inibidor de PKC), U0126 (5  $\mu\text{g}$ /sítio, i.c.v., inibidor de MEK1/2), PD09058 (5  $\mu\text{g}$ /sítio, inibidor da MEK1/2), LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v., inibidor de PI3K), wortmanina (0,1  $\mu\text{g}$ /sítio, inibidor de PI3K), rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v., inibidor de mTOR), protoporfirina de zinco (10  $\mu\text{g}$ /sítio, i.c.v., inibidor da enzima heme oxigenase-1). Além

disso, creatina (0,01 mg/kg, dose sub-efetiva) em combinação com doses sub-efetivas de SKF38393 (0,1 mg/kg, s.c., agonista de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>), apomorfina (0,5 mg/kg, ip, agonista preferencial de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>), fenilefrina (0,4 µg/sítio, i.c.v., agonista de receptores α<sub>1</sub>-adrenérgico), WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), fluoxetina (5 mg/kg, p.o., antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina (ISRS)), paroxetina (0,1 mg/kg, p.o., ISRS), citalopram (0,1 mg/kg, p.o., ISRS), sertralina (3 mg/kg, p.o., ISRS), amitriptilina (1 mg/kg, p.o., antidepressivo tricíclico), imipramina (0,1 mg/kg, p.o., antidepressivo tricíclico), reboxetina (2 mg/kg, p.o., antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina, ISRN), bupropiona (1 mg/kg, p.o., antidepressivo inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina), MK-801 (0,01 mg/kg, p.o., antagonista de receptores de NMDA), cetamina (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores NMDA), AR-A014418 (0,01 µg/sítio, i.c.v., inibidor seletivo da enzima GSK-3β), cloreto de lítio (10 mg/kg, p.o., inibidor não seletivo da enzima GSK-3β), protoporfirina de cobalto (0,01 µg/sítio, i.c.v., indutor da expressão de HO-1) reduziu o tempo de imobilidade no TSC, em comparação com qualquer um dos fármacos administrados isoladamente. Este conjunto de resultados sugere que o efeito antidepressivo da creatina no TSC seja mediado por uma ativação de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, bem como dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e α<sub>1</sub>-adrenérgico, e uma inativação de receptores glutamatérgicos NMDA, além de envolver a ativação de PKA, PKC, MEK1/2, PI3K/AKT, mTOR, HO-1 e uma inibição de GSK-3β. Tendo em vista que existe uma grande comorbidade entre a depressão e a doença de Parkinson (DP), e sabendo que antidepressivos de distintas classes protegem da morte celular induzida por toxinas dopaminérgicas, como a 6-OHDA, o segundo capítulo desta tese investigou o efeito neuroprotetor da creatina frente a morte celular induzida pela toxina dopaminérgica 6-OHDA. Esta diminuiu a viabilidade de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, bem como de fatias de estriado cerebral de ratos. A creatina apresentou um efeito protetor contra a toxicidade induzida por 6-OHDA (10–5000 µM) em células SH-SY5Y e este efeito foi revertido por diferentes inibidores de cinases: LY294002 (10 µM), KN-93 (1 µM, inibidor de CaMK-2), H-89 (2 µM), PD98059 (10 µM) e queleritrina (0,1 µM). Além disso, 6-OHDA reduziu a fosforilação de GSK-3β (Ser<sup>9</sup>) em células SH-SY5Y e a incubação com creatina reverteu este efeito. Ainda, 6-OHDA (50-300 µM) reduziu a viabilidade celular em fatias de estriado de ratos e creatina ou fosfocreatina (2,5-10 mM) reverteu

este efeito. Ainda, verificamos que 6-OHDA aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e induz uma diminuição na fosforilação de AKT (Ser<sup>473</sup>) e GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) em fatias de estriado de ratos, sendo que a creatina ou fosfocreatina (5 mM) reverteu este efeito. O inibidor da PI3K LY294002 (30  $\mu$ M) reverteu o efeito da creatina e da fosfocreatina sobre a viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio em fatias de estriado expostas a 6-OHDA. Além disso, 6-OHDA diminuiu o imunconteúdo de tirosina hidroxilase e creatina ou fosfocreatina reverteu este efeito. O efeito protetor de creatina ou fosfocreatina na modulação do imunconteúdo de tirosina hidroxilase em fatias de estriado de ratos expostas a 6-OHDA parece ser dependente da ativação da via de sinalização intracelular PI3K/AKT, uma vez que LY294002 (30  $\mu$ M) reverteu este efeito. Este segundo conjunto de resultados sugere que a creatina apresenta efeito neuroprotetor frente à morte celular induzida por 6-OHDA e este efeito parece ser devido a propriedades antioxidantes e ativação das vias de sinalização intracelular mediadas por PKA, PKC, MEK1/2, PI3K/AKT e uma inibição de GSK-3 $\beta$ . Esta tese sugere que a creatina pode ser uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da depressão e da DP.

**Palavras-chave:** 6-OHDA, Antidepressivo, Glutamato, Monoaminas, Neuroproteção, PI3K; Teste da Suspensão pela Cauda.





## ABSTRACT

Creatine modulates cellular bioenergetics and presents antiexcitotoxic, antioxidant, neuroprotective and antidepressant properties; however, the intracellular mechanisms responsible for these effects are not well established. In the first chapter of this thesis, the effect of creatine administration (p.o.) in the mouse tail suspension test (TST), a test predictive of antidepressant activity, was investigated. In addition, the possible involvement of neurotransmission systems (dopaminergic, serotonergic, noradrenergic and glutamatergic), and the intracellular signaling pathways mediated by L-arginine/nitric oxide (NO), protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK 1/2)/ extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2),  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase-2 (CaMK-2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT), glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), mammalian target of rapamycin (mTOR) and heme oxygenase-1 (HO-1) in the antidepressant-like effect of creatine in the TST was evaluated. The administration of creatine (0.1-1000 mg/kg) reduced the immobility time in mice submitted to the TST, without changing locomotor activity. The anti-immobility effect of creatine in the TST was blocked by pretreatment of mice with p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA; 100 mg/kg, i.p., for 4 consecutive days, inhibitor of serotonin (5-HT) synthesis),  $\alpha$ -methyl-p-tyrosine (AMPT, 100 mg/kg, i.p., inhibitor of tyrosine hydroxylase), haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., non-selective dopamine receptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist), sulpiride (50 mg/kg, i.p., dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist), prazosin (1 mg/kg, i.p.,  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist), NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.), D-serine (30  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., agonist of the glycine site of the NMDA receptor), arcaine (1 mg/kg, i.p., antagonist of the polyamine site of the NMDA receptor), L- arginine (750 mg/kg, i.p., a precursor of nitric oxide, NO), SNAP (25  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., NO donor), 7-nitroindazole (25 mg/kg, i.p., inhibitor of neuronal nitric oxide synthase), H-89 (1  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., PKA inhibitor), KN-62 (1  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., CaMK-2 inhibitor), chelerythrine (1  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., PKC inhibitor), U0126 (5  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., MEK1/2 inhibitor), PD09058 (5  $\mu\text{g}/\text{site}$ , MEK1/2 inhibitor), LY294002 (10 nmol/site, i.c.v., PI3K inhibitor), wortmannin (0.1  $\mu\text{g}/\text{site}$ , PI3K inhibitor), rapamycin (0.2 nmol/site, i.c.v., mTOR inhibitor), zinc protoporphyrin (10  $\mu\text{g}/\text{site}$ , i.c.v., HO-1 inhibitor). Furthermore, creatine (0.01 mg/kg, sub-effective dose) in combination with sub-effective doses of SKF38393 (0.1 mg/kg s.c., dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist), apomorphine

(0.5 mg/kg, i.p., preferential agonist of dopamine D<sub>2</sub> receptor), phenylephrine (0.4 mg/site, i.c.v.,  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist) 8-OH-DPAT (0.1 mg/kg, i.p., a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist), fluoxetine (5mg/kg, p.o., selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o., SSRI), citalopram (0.1 mg/kg, p.o., SSRI), sertraline (3 mg/kg, p.o., SSRI), amitriptyline (1 mg/kg p.o., tricyclic antidepressant), imipramine (0.1 mg/kg, p.o., tricyclic antidepressant), reboxetine (2 mg/kg, p.o., selective noradrenaline reuptake inhibitor), bupropion (1 mg/kg, p.o., dopamine and noradrenaline reuptake inhibitor), MK-801 (0.01 mg/kg, p.o., NMDA receptor antagonist) ketamine (0.1 mg/kg, i.p., NMDA receptor antagonist), AR-A014418 (0.01/site, i.c.v., GSK-3 $\beta$  inhibitor), lithium chloride (10 mg/kg, p.o., non-selective GSK-3 $\beta$  inhibitor), cobalt protoporphyrin (0.01  $\mu$ g/site, i.c.v., inducer of HO-1 expression) decreased the immobility time in the TST as compared to either drug administered alone. This set of results suggest that the antidepressant-like effect of creatine in the TST is mediated by the activation of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, 5-HT<sub>1A</sub> receptors, and  $\alpha_1$ -adrenoceptors as well as an inactivation of NMDA receptors. Moreover, this set of results also indicates that activation of PKA, PKC, MEK1/2, PI3K/AKT, mTOR, HO-1 and inhibition of GSK-3 $\beta$  are involved in the antidepressant-like effect of creatine in the TST. Considering: i) the high depression and Parkinson's disease comorbidity; ii) antidepressants of different classes protect the cell death induced by dopaminergic toxins, such as 6-OHDA, the second chapter of this thesis also evaluated the neuroprotective effect of creatine against cell death induced by the dopaminergic toxin 6-OHDA. We demonstrated that 6-OHDA decreased the cell viability of human neuroblastoma cells SH-SY5Y, as well as rat striatal slices. Creatine protected against the toxicity induced by 6-OHDA (10-5000 mM) in SH-SY5Y cells and this effect was reversed by different kinase inhibitors: LY294002 (10  $\mu$ M), KN-93 (1  $\mu$ M, CaMK-2 inhibitor), H-89 (2  $\mu$ M), PD98059 (10  $\mu$ M) and chelerythrine (0.1  $\mu$ M). Furthermore, 6-OHDA reduced phosphorylation of GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) in SH-SY5Y cells and creatine (10  $\mu$ M) reversed this effect. Also, 6-OHDA (50-300  $\mu$ M) reduced cell viability and increased the production of reactive oxygen species in rat striatal slices and creatine or phosphocreatine (2.5-10 mM) reversed this effect. We also find that 6-OHDA decreased the phosphorylation of AKT (Ser<sup>473</sup>) and GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) in rat striatal slices and creatine or phosphocreatine reversed this effect. The PI3K inhibitor LY294002 (30 mM) reversed the protective effect of creatine or phosphocreatine against cell viability and production of reactive oxygen

species in striatal slices exposed to 6-OHDA. Furthermore, 6-OHDA decreased the tyrosine hydroxylase immunocontent and phosphocreatine or creatine reversed this effect. The effect of creatine or phosphocreatine on the modulation of tyrosine hydroxylase immunocontent in rat striatal slices exposed to 6-OHDA could be dependent on the activation of the intracellular signaling pathway mediated by PI3K/AKT, since LY294002 (30 mM) reversed this effect. This second set of data suggests that creatine has neuroprotective effect against cell death induced by 6-OHDA and this effect could be due to the antioxidant properties and activation of intracellular signaling pathways mediated by PKA, PKC, MEK1/2, PI3K/AKT and an inhibition of GSK-3 $\beta$ . This thesis suggests that creatine may be a novel therapeutic alternative for the treatment of depression and Parkinson's disease.

**Keywords:** 6-OHDA, Antidepressant, Glutamate, Monoamine, Neuroprotective, PI3K; Tail Suspension Test.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das moléculas de creatina, fosfocreatina e creatinina.....	PÁGINA 42
Figura 2. Rota de síntese de creatina em mamíferos.....	PÁGINA 46
Figura 3. Modelo de síntese e transporte de creatina no SNC.....	PÁGINA 49
Figura 4. Modelo de transporte de creatina e guanidinoacetato através da barreira hematoencefálica e do fluído cérebro-espinal.....	PÁGINA 50
Figura 5. Acoplamento da síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons e o sistema creatina cinase/fosfocreatina.....	PÁGINA 53
Figura 6. Sistema creatina cinase/fosfocreatina.....	PÁGINA 54
Figura 7. Mecanismo de exocitose da creatina.....	PÁGINA 56
Figura 8. Alvos toxicologicamente relevantes a processos de estresse oxidativo e revertidos ou atenuados pelo tratamento com creatina em células C2C12.....	PÁGINA 65
Figura 9. Sistema creatina cinase/fosfocreatina e o papel da mitocôndria na morte celular programada em neurônios.....	PÁGINA 68
Figura 10. Efeito da suplementação com creatina em diversas doenças.....	PÁGINA 70
Figura 11. Envolvimento mitocondrial na doença de Parkinson (DP) e o efeito terapêutico da suplementação com creatina.....	PÁGINA 72
Figura 12. Hipótese monoaminérgica da depressão.....	PÁGINA 91
Figura 13. Distinção entre os efeitos mediados por fármacos que modulam o sistema serotoninérgico (efeito lento) e os que modulam o sistema glutamatérgico (efeito rápido).....	PÁGINA 93
Figura 14. Clássica hipótese do envolvimento dos subtipos de receptores glutamatérgicos NMDA e da via L-arginina/Óxido Nítrico na etiologia da depressão.....	PÁGINA 96
Figura 15. Ativação de PKA por antidepressivos.....	PÁGINA 98
Figura 16. Convergência de cascatas de sinalização intracelular mediada por diferentes respostas celulares ao estresse/depressão e antidepressivos.....	PÁGINA 101
Figura 17. Cinases envolvidas na fosforilação e inativação de GSK3 $\beta$ .....	PÁGINA 102
Figura 18. Cascatas de sinalização intracelular mediadas por Keap1/Nrf2 que regulam a expressão gênica de Hemeoxigenase-1.....	PÁGINA 104
Figura 19. Ação antidepressiva rápida da cetamina mediada por ativação de mTOR.....	PÁGINA 106

Figura 20. Protocolo experimental da administração de doses crescentes de creatina em camundongos submetidos ao TSC.....	PÁGINA 117
Figura 21. Protocolo experimental da interação de creatina e agentes farmacológicos no TSC.....	PÁGINA 118
Figura 22. Esquema do efeito de moduladores farmacológicos de sistemas de neurotransmissão e de vias de sinalização intracelular no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 119
Figura 23. Teste da Suspensão pela Cauda (TSC).....	PÁGINA 120
Figura 24. Teste do campo aberto (TCA).....	PÁGINA 121
Figura 25. Efeito do tratamento com creatina (0,01-1000 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TSC em camundongos.....	PÁGINA 124
Figura 26. Envolvimento da ativação dopaminérgica no efeito tipo-antidepressivo da creatina.....	PÁGINA 129
Figura 27. Interação de creatina com ativadores da neurotransmissão dopaminérgica no TSC.....	PÁGINA 130
Figura 28. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 135
Figura 29. Interação de creatina e ISRS no TSC.....	PÁGINA 136
Figura 30. Envolvimento dos receptores $\alpha_1$ -adrenérgicos no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 142
Figura 31. Interação da creatina e ativadores da neurotransmissão noradrenérgica no TSC.....	PÁGINA 143
Figura 32. Envolvimento dos receptores NMDA no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 150
Figura 33. Envolvimento da via L-arginina/ON no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 155
Figura 34. Modelo experimental proposto para o mecanismo de ação envolvido no efeito antidepressivo da creatina, através de uma inativação dos receptores NMDA e aumento dos níveis de ON.....	PÁGINA 159
Figura 35. Envolvimento de PKA, CaMK-2, MEK/ERK 1/2, e PKC no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 162
Figura 36. Envolvimento de PI3K no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 167
Figura 37. Creatina aumenta a fosforilação de AKT em hipocampo de camundongos.....	PÁGINA 168
Figura 38. Creatina aumenta a fosforilação de AKT em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.....	PÁGINA 169
Figura 39. Envolvimento de alvos da AKT: GSK-3 $\beta$ , nrf2/HO-1, e mTOR no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.....	PÁGINA 172

Figura 40. Modelo experimental do mecanismo de ação molecular, através da ativação de PI3K/AKT e seus alvos intracelulares, induzido pelo tratamento com creatina responsável por seu efeito antidepressivo.....	PÁGINA 176
Figura 41. Modelo experimental final dos mecanismos de ação implicados no efeito antidepressivo da creatina.....	PÁGINA 178
Figura 42. Fisiopatologia da doença de Parkinson (DP).....	PÁGINA 185
Figura 43. Representação esquemática do metabolismo do MPTP, das vias do MPP <sup>+</sup> intracelular, bem como das toxinas 6-OHDA, rotenona, Paraquat e Maneb.....	PÁGINA 188
Figura 44. Células SH-SY5Y.....	PÁGINA 198
Figura 45. Metodologia de preparação e análise de viabilidade celular das fatias de estriado de ratos.....	PÁGINA 200
Figura 46. Toxicidade induzida por 6-OHDA em células de neuroblastoma humano.....	PÁGINA 206
Figura 47. Efeito protetor da creatina na morte de células SH-SY5Y induzida pelo tratamento com 6-OHDA.....	PÁGINA 209
Figura 48. Envolvimento de PKA, PKC, MEK 1/2 e PI3K/AKT no efeito protetor da creatina na morte celular induzida por 6-OHDA.....	PÁGINA 212
Figura 49. Proteção induzida pela creatina contra a toxicidade induzida por 6-OHDA em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y está associada com fosforilação de GSK-3β.....	PÁGINA 215
Figura 50. Efeito neurotóxico da 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.....	PÁGINA 217
Figura 51. Efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina na morte celular em fatias de estriado de ratos induzida por 6-OHDA.....	PÁGINA 221
Figura 52. Investigação do efeito da creatina e da fosfocreatina na autooxidação de 6-OHDA.....	PÁGINA 224
Figura 53. Efeito antioxidante da creatina e da fosfocreatina em fatias de estriado de ratos expostas a 6-OHDA.....	PÁGINA 226
Figura 54. Envolvimento da PI3K/AKT no efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina em relação à toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.....	PÁGINA 229
Figura 55. Envolvimento da PI3K/AKT no efeito da creatina e da fosfocreatina sobre o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase em relação à toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.....	PÁGINA 232

Figura 56. Envolvimento da PI3K/AKT no efeito antioxidante da creatina e da fosfocreatina sobre a produção de ERO induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.....	PÁGINA 234
Figura 57. Modelo experimental do mecanismo de ação intracelular implicado no efeito neuroprotetor da creatina em relação à morte celular induzida por 6-OHDA.....	PÁGINA 237



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Concentrações de creatina em alimentos.....	PÁGINA 45
Tabela 2. Principais estudos que investigam alterações em relação ao estresse oxidativo induzidos pelo tratamento com creatina.....	PÁGINA 60
Tabela 3. Estudos que reportaram mudanças nos níveis de creatina/fosfocreatina, transportador de creatina e atividade da enzima creatina cinase em animais submetidos ao estresse e/ou antidepressivos.....	PÁGINA 73
Tabela 4. Principais estudos demonstrando alterações dos níveis de creatina e fosfocreatina em estruturas encefálicas e a atividade da enzima creatina cinase no sangue de pacientes depressivos.....	PÁGINA 76
Tabela 5. Principais estudos investigando o efeito antidepressivo da suplementação com creatina em pacientes depressivos.....	PÁGINA 78
Tabela 6. Sintomas dos transtornos depressivos segundo o DSM-IV-TR e o CID-10.....	PÁGINA 88
Tabela 7. Sintomas comuns a DP e a depressão.....	PÁGINA 190



## **LISTA DE ESQUEMAS**

Esquema 1. Esquema representativo da ação da enzima creatina cinase proposto inicialmente por Karl Lohmann (1934).....	PÁGINA 42
Esquema 2. Esquema representativo da ação da enzima creatina cinase proposto por Lehmann (1936).....	PÁGINA 43



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

4-EBP1 = proteína ligante 1 do fator de iniciação eucariótico 4  
5-HT = serotonina  
ADP = adenosina difosfato  
AGAT = L-arginina glicina amidinotransferase  
ANOVA = análise de variância  
ARE = elemento de resposta antioxidante  
Arg = arginina  
ATP = adenosina trifosfato  
BDNF = fator neurotrófico derivado do encéfalo  
CaMK-2 = cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina  
CCVD = canal de cálcio voltagem dependente  
CEPC = células epiteliais do plexo coróide  
CID-10 = Classificação Internacional de Doenças  
CK = creatina cinase  
CREB = proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico  
CrP = fosfocreatina  
DCFH = diclorofluoresceína  
DSM-IV-TR = Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais – 4ª edição revisada  
ECM = matrix extracelular  
E.P.M = erro padrão da média  
ERK = cinase ativada por estímulos extracelulares  
EROS = Espécies reativas de oxigênio  
FCE = fluído cérebro-espinhal  
GAA = guanidinoacetato  
GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
GAMT = guanidinoacetato metiltransferase  
Gly = glicina  
GSH = glutationa  
GSK-3 $\beta$  = glicogênio sintase cinase 3 $\beta$   
HO-1 = hemeoxigenase-1  
i.p.= intraperitoneal  
i.c.v. = intracerebroventricular  
IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina-1  
IMAO = inibidor da monoamina oxidase  
ISRN = inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina  
ISRS = inibidor seletivo da recaptação de serotonina  
MAPKK = cinase da cinase ativada por mitógenos (ou MEK)

MCEC = células endoteliais de microcapilares  
mPTP = poro de transição permeável mitocondrial  
MRF = fatores regulatórios do músculo  
MtCK = creatina cinase mitocondrial  
mtDNA = DNA mitocondrial  
mTOR = proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
NGF = fator de crescimento do nervo  
NMDA = N-metil-D-aspartato  
ON = óxido nítrico  
NOS = óxido nítrico sintase  
Nrf-2 = fator relacionado ao fator nuclear do eritróide-2  
PDK1 = cinase dependente de fosfatidilinositol 1  
PGC-1 $\alpha$  = coativador do receptor ativado pelo proliferador peroxissomal  $\lambda$ -1 $\alpha$   
Pi3K = fosfatidilinositol 3 cinase  
PKB = proteína cinase B (ou AKT)  
PKC = proteína cinase C  
PKA = proteína cinase dependente de AMPc  
PLC = fosfolipase C  
p.o.= per os (via oral)  
s.c. = subcutânea  
SLC6A8 = transportador de creatina  
SNC = sistema nervoso central  
TauT = transportador de taurina  
TBARS = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TNF = teste do nado forçado  
TSC = teste da suspensão pela cauda  
TCA= teste do campo aberto  
VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	PÁGINA 41
1.1.	CREATINA.....	PÁGINA 41
1.1.1.	Histórico.....	PÁGINA 41
1.1.2.	Distribuição em tecidos corporais e síntese.....	PÁGINA 44
1.1.3.	Sistema de transporte.....	PÁGINA 47
1.1.4.	Sistema creatina cinase/fosfocreatina.....	PÁGINA 51
1.1.5.	Creatina e neuromodulação.....	PÁGINA 55
	i) Regulação da homeostase de Cálcio...	PÁGINA 56
	ii) Sistema glutamatérgico.....	PÁGINA 57
1.1.6.	Creatina e sistema antioxidante.....	PÁGINA 58
1.1.7.	Creatina e inflamação.....	PÁGINA 65
1.1.8.	Creatina e vias de sinalização intracelular.....	PÁGINA 66
1.1.9.	Creatina e morte celular.....	PÁGINA 67
1.1.10.	Suplementação com creatina e benefícios em patologias.....	PÁGINA 69
1.1.11.	Sistema creatina cinase/fosfocreatina em transtornos no sistema nervoso central.....	PÁGINA 70
	i) Doença de Parkinson (DP).....	PÁGINA 71
	ii) Depressão.....	PÁGINA 73
1.1.12.	Efeitos adversos.....	PÁGINA 79
Capítulo 1.....		PÁGINA 81
1.	INTRODUÇÃO.....	PÁGINA 83
1.1.	DEPRESSÃO.....	PÁGINA 83
1.1.1.	Histórico.....	PÁGINA 83
1.1.2.	Prevalência.....	PÁGINA 85
1.1.3.	Caracterização, sintomas e diagnóstico...	PÁGINA 86
1.1.4.	Sistemas de neurotransmissão envolvidos na fisiopatologia da depressão.....	PÁGINA 88
	i) Monoaminérgico.....	PÁGINA 88
	a) Serotonina (5-HT) e depressão.....	PÁGINA 88
	b) Noradrenalina (NA) e depressão.....	PÁGINA 89
	c) Dopamina e depressão.....	PÁGINA 89
	ii) Glutamatérgico.....	PÁGINA 91

1.1.5.	Cinases intracelulares envolvidas na fisiopatologia da depressão.....	PÁGINA 96
1.1.6.	Hipótese inflamatória.....	PÁGINA 107
1.1.7.	Disfunções metabólicas envolvidas na depressão.....	PÁGINA 107
2.	JUSTIFICATIVA.....	PÁGINA 111
3.	OBJETIVOS.....	PÁGINA 113
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	PÁGINA 113
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	PÁGINA 113
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	PÁGINA 115
4.1.	ANIMAIS.....	PÁGINA 115
4.2.	DROGAS.....	PÁGINA 115
4.3.	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	PÁGINA 117
4.3.1.	Investigação do efeito antidepressivo da administração aguda de creatina em doses crescentes por via oral.....	PÁGINA 117
4.3.2.	Protocolos que buscam verificar o efeito antidepressivo sinérgico de creatina, em dose sub-efetiva (uma dose que não apresenta efeito per se) em combinação com compostos farmacológicos.....	PÁGINA 118
4.3.3.	Protocolos que buscam verificar se o efeito antidepressivo da creatina pode ser revertido por agentes farmacológicos de distintas classes.....	PÁGINA 119
4.4.	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	PÁGINA 119
4.4.1.	Teste da suspensão pela Cauda (TSC).....	PÁGINA 119
4.4.2.	Teste do campo aberto (TCA).....	PÁGINA 120
4.5.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	PÁGINA 121
4.5.1.	Análise de NOx.....	PÁGINA 121
4.5.2.	Western Blot.....	PÁGINA 122
4.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	PÁGINA 122
5.	RESULTADOS.....	PÁGINA 123
5.1.	AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE CREATINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TSC.....	PÁGINA 123
5.1.1.	Discussão.....	PÁGINA 125
5.2.	ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D <sub>1</sub> E D <sub>2</sub> NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE CREATINA.....	PÁGINA 127



5.2.1. Discussão.....	PÁGINA 131
5.3. ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR 5-HT <sub>1A</sub> PRÉ E PÓS-SINÁPTICO NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA.....	PÁGINA 133
5.3.1. Discussão.....	PÁGINA 137
5.4. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES $\alpha_1$ -ADRENÉRGICO NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA.....	PÁGINA 140
5.4.1. Discussão.....	PÁGINA 144
5.5. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA.....	PÁGINA 148
5.5.1. Discussão.....	PÁGINA 151
5.6. ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA/ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA.....	PÁGINA 153
5.6.1. Discussão.....	PÁGINA 156
5.7. ENVOLVIMENTO DE PKA, CaMK-2, PKC, MEK1/2 NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA NO TSC.....	PÁGINA 160
5.7.1. Discussão.....	PÁGINA 163
5.8. ENVOLVIMENTO DA PI3K/AKT NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA.....	PÁGINA 166
5.8.1. Discussão.....	PÁGINA 173
6. CONCLUSÕES.....	PÁGINA 177
Capítulo 2.....	PÁGINA 179
1. INTRODUÇÃO.....	PÁGINA 181
1.1. DOENÇA DE PARKINSON (DP).....	PÁGINA 181
1.1.1. Histórico.....	PÁGINA 181
1.1.2. Prevalência.....	PÁGINA 183
1.1.3. Caracterização, sintomas e diagnóstico.....	PÁGINA 183
1.1.4. Modelos in vivo e in vitro da DP.....	PÁGINA 187
1.1.5. Comorbidade entre a depressão e a DP.....	PÁGINA 188
1.1.6. Proteínas cinase envolvidas na fisiopatologia da DP.....	PÁGINA 190
2. JUSTIFICATIVAS.....	PÁGINA 193
3. OBJETIVOS.....	PÁGINA 195
3.1. OBJETIVO GERAL.....	PÁGINA 195
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	PÁGINA 195
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	PÁGINA 197

4.1. ANIMAIS.....	PÁGINA 197
4.2. DROGAS E REAGENTES.....	PÁGINA 197
4.3. SH-SY5Y.....	PÁGINA 197
4.4. TRATAMENTOS EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	PÁGINA 199
4.5. PREPARAÇÃO DAS FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 199
4.6. TRATAMENTO DAS FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 201
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR POR MENSURAÇÃO DO METABOLISMO DE MTT.....	PÁGINA 201
4.8. QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR POR MENSURAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....	PÁGINA 201
4.9. VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 202
4.10. ESTUDOS DE AUTOOXIDAÇÃO DE 6-OHDA.....	PÁGINA 202
4.11. WESTERN BLOT.....	PÁGINA 203
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	PÁGINA 203
5. RESULTADOS.....	PÁGINA 205
5.1. EFEITO DE 6-OHDA NA VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y.....	PÁGINA 205
5.1.1. Discussão.....	PÁGINA 207
5.2. EFEITO DA CREATINA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE 6-OHDA EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	PÁGINA 208
5.2.1. Discussão.....	PÁGINA 210
5.3. IMPLICAÇÃO DAS CINASES PI3K/AKT, PKA, PKC, MEK1/2 E CAMK-2 NO EFEITO PROTETOR DA CREATINA EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	PÁGINA 211
5.3.1. Discussão.....	PÁGINA 213
5.4. EFEITO DA CREATINA SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE GSK-3 $\beta$ em células SH-SY5Y.....	PÁGINA 215
5.4.1. Discussão.....	PÁGINA 216
5.5. EFEITO DE 6-OHDA NA VIABILIDADE DE FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 217
5.5.1. Discussão.....	PÁGINA 218

5.6.	EFEITO DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 220
5.6.1.	Discussão.....	PÁGINA 222
5.7.	EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 224
5.7.1.	Discussão.....	PÁGINA 227
5.8.	ENVOLVIMENTO DE PI3K/AKT NO EFEITO NEUROPROTETOR DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 228
5.8.1.	Discussão.....	PÁGINA 230
5.9.	ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT NO EFEITO DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS DE TIROSINA HIDROXILASE INDUZIDA POR 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 231
5.9.1.	Discussão.....	PÁGINA 233
5.10.	ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT NO EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS.....	PÁGINA 234
5.10.1.	Discussão.....	PÁGINA 235
6.	CONCLUSÃO.....	PÁGINA 236
	DISCUSSÃO INTEGRADA.....	PÁGINA 238
	PERSPECTIVAS.....	PÁGINA 241
	REFERÊNCIAS.....	PÁGINA 243



## LISTA DE PUBLICAÇÕES DURANTE O TRANSCURSO DA TESE DE DOUTORADO:

### ARTIGOS PUBLICADOS

1. MACHADO, DANIELE G. ; BETTIO, LUIS E.B. ; CUNHA, MAURICIO P. ; CAPRA, JULIANO C. ; DALMARCO, JULIANA B. ; PIZZOLATTI, MOACIR G. ; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 33, p. 642-650, 2009.
2. SCHWARZBOLD, MARCELO L. ; RIAL, DANIEL ; DE BEM, TATIANA ; MACHADO, DANIELE G. ; CUNHA, MAURICIO P. ; DOS SANTOS, ALESSANDRA A. ; DOS SANTOS, DANÚBIA B. ; FIGUEIREDO, CLÁUDIA P. ; FARINA, MARCELO ; GOLDFEDER, ELIANE M. ; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. ; PREDIGER, RUI D.S. ; WALZ, ROGER . Effects of Traumatic Brain Injury of Different Severities on Emotional, Cognitive, and Oxidative Stress-Related Parameters in Mice. Journal of Neurotrauma, v. 27, p. 1883-1893, 2010.
3. CAPRA, JULIANO C.; CUNHA, MAURICIO P. ; MACHADO, DANIELE G. ; ZOMKOWSKI, ANDREA D.E. ; MENDES, BEATRIZ G. ; SANTOS, ADAIR ROBERTO S. ; PIZZOLATTI, MOACIR G. ; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. European Journal of Pharmacology, v. 643, p. 232-238, 2010.
4. BETTIO, LUIS E.B. ; MACHADO, DANIELE G. ; CUNHA, MAURICIO P. ; CAPRA, JULIANO C. ; MISSAU, FABIANA C. ; SANTOS, ADAIR R.S. ; PIZZOLATTI, MOACIR G. ; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. . Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems . Pharmaceutical Biology, v. 49, p. 1277-1285, 2011.
5. ZOMKOWSKI, A. D. E. ; ENGEL, D. ; CUNHA, M. P. ; GABILAN, N. H. ; RODRIGUES, A. L. S. . The role of the NMDA receptors and L-arginine nitric oxide cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of

- duloxetine in the forced swimming test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 103, p. 408-417, 2012.
6. MACHADO, D. G. ; NEIS, V.B. ; BALEN, G.O. ; COLLA, A. R. ; CUNHA, M. P. ; DALMARCO, J.B. ; PIZZOLATTI, M.G. ; PREDIGER, R. D. S. ; RODRIGUES, A. L. S. . Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 103, p. 204-211, 2012.
  7. MACHADO, D. G. ; CUNHA, M. P. ; NEIS, V.B. ; Balen, G.O. ; COLLA, A. R. ; GRANDO, J. ; BROCARDO, P. S. ; BETTIO, L. E. ; CAPRA, J. C. ; RODRIGUES, A.L S. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 103, p. 220-229, 2012.
  8. MACHADO, D. G. ; CUNHA, M. P. ; NEIS, V.B. ; Balen, G.O. ; GRANDO, J. ; BROCARDO, P. S. ; BETTIO, L. E. ; DALMARCO, J.B.; RIAL, D. ; PREDIGER, R. D. S. ; PIZZOLATTI, M.G. ; RODRIGUES, A. L. S. . *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 11, p. 22, 2012.
  9. BETTIO, L. E. ; CUNHA, M. P. ; BUDNI, J. ; PAZINI, F. L. ; OLIVEIRA, A. ; COLLA, A. R. ; RODRIGUES, A. L. S. . Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behavioural Brain Research*, v. 234, p. 137-148, 2012.
  10. CUNHA, M. P. ; MACHADO, D. G. ; CAPRA, J. C. ; JACINTO, J. ; BETTIO, L. E. B. ; RODRIGUES, A. L. S. . Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. *Journal of Psychopharmacology (Oxford)*, v. 26, p. 1489-1501, 2012.
  11. MACHADO, DANIELE G. ; CUNHA, M. P. ; NEIS, VIVIAN B. ; BALEN, GRASIELA O. ; COLLA, ANDRÉ ; BETTIO, LUIS E.B. ; OLIVEIRA, ÁGATHA ; PAZINI, FRANCIS LEONARDO ; DALMARCO, JULIANA B. ; SIMIONATTO, EDÉSIO LUIZ ; PIZOLLATTI MG ; PIZZOLATTI, MOACIR G. ; RODRIGUES,

- ANA LÚCIA S. . Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L.. Food Chemistry, v. 136, p. 999-1005, 2013.
12. CUNHA, M. P. ; SAAVEDRA, M. D. M. ; ROMERO, A. ; PARADA, E. ; EGEA, J. ; BARRIO, L. ; RODRIGUES, A. L. S. ; LOPEZ, M. G. . Protective Effect of Creatine Against 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Death In Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells: Involvement of Intracellular Signaling Pathways. Neuroscience, v. 238, p. 185-194, 2013.
  13. CUNHA, M. P. ; PAZINI, F. L. ; OLIVEIRA, A. ; BETTIO, L. E. ; ROSA, J. M. ; MACHADO, D. G. ; RODRIGUES, A. L. S. . The activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 44, p. 39-50, 2013.
  14. CUNHA, M. P. ; OLIVEIRA, A. ; PAZINI, F. L. ; MACHADO, D. G. ; BUDNI, J. ; BETTIO, L. E. ; AGUIAR-JR, A.S. ; Martins, D.F. ; Santos, A.R.S. ; RODRIGUES, A. L. S. . The Antidepressant-like Effect of Physical Activity in the Voluntary Running Wheel. Medicine and Science in Sports and Exercise, v. 45, p. 851-859, 2013.
  15. LUDKA, FABIANA K. ; ZOMKOWSKI, ANDRÉA D.E. ; CUNHA, MAURICIO P.; DAL-CIM, THARINE ; ZENI, ANA LÚCIA B. ; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. ; TASCA, CARLA I. . Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the l-arginine nitric oxide cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. European Neuropsychopharmacology, v. 23, p. 400-412, 2013.
  16. CUNHA, M. P. ; PAZINI, F. L. ; OLIVEIRA, A. ; MACHADO, D. G. ; RODRIGUES, A. L. S. . Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. Brain Research Bulletin, v.95, p. 61-69, 2013.

### **ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO**

1. KASTER, M. P. ; BUDNI, J. ; GAZAL, M. ; CUNHA, M. P. ; SANTOS, A. R. S. ou SANTOS, A.R. ; RODRIGUES, A. L. S. . The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. Purinergic Signalling (Print), 2013.

2. SAAVEDRA, M. D. M. ; BUDNI, J. ; CUNHA, M. P. ; GOMEZ-RANGEL, V. ; LORRIO, S. ; BARRIO, L. ; LASTRES-BECKER, I. ; PARADA, E. ; RODRIGUES, A. L. S. ; LOPEZ, M. G. . Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. Psychoneuroendocrinology, 2013.



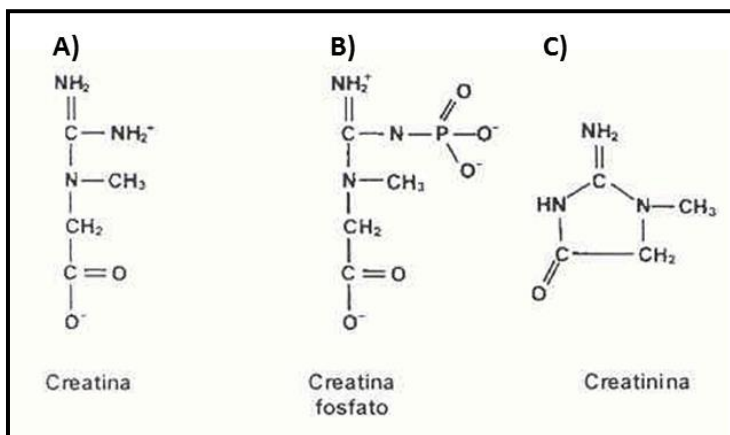
## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. CREATINA

#### 1.1.1. Histórico

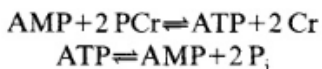
Em 1832, o cientista francês Michel Eugene Chevreul identificou um novo constituinte orgânico em um extrato de carne e o nomeou creatina (N-[aminoiminometil]-N-metilglicina, Figura 1A). O termo creatina vem do grego *kreas* que significa carne. Devido a problemas técnicos, apenas em 1847, o cientista sueco Justus Liebig foi capaz de confirmar a presença de creatina e caracterizá-la como um constituinte regular das carnes. Liebig também observou que o músculo de raposas selvagens que sobreviviam da caça continha 10 vezes mais creatina em comparação às raposas mantidas em cativeiro, concluindo que o trabalho muscular resultava no acúmulo dessa substância. Na mesma época, os pesquisadores Heitz e Pettenkoffer descobriram uma nova substância presente na urina, mais tarde identificada por Liebig como creatinina (Figura 1C), um subproduto da creatina. Quase cem anos mais tarde (1923), o médico alemão Hans Meyer postulou que o corpo de um ser humano de 70 kg e não vegetariano apresentava cerca de 140 gramas de creatina. Em seguida, os pesquisadores da *Harvard Medical School* Cyrus Fiske e Yellapragada Subbarow e paralelamente Grace Eggleton e Philip Eggleton na *University of Cambridge* (1927) descobriram a molécula de creatina fosfato ou fosfocreatina (Figura 1B), que devido a sua natureza lábil foi chamada de “fosfágeno”.

Em 1930, Lundsgaard demonstrou que a contração muscular era acompanhada por uma maior quebra de fosfocreatina do que de uma produção de lactato, e propôs que a fosfocreatina apresentava um envolvimento central no suporte energético para a contração muscular (DEMANT e RHODES, 1999). Na contração muscular havia liberação de uma molécula de creatina livre (BESSMAN *et al.*, 1980) e assim neste momento se atribuiu à fosfocreatina o papel de provedora de energia química para o processo de contração muscular. Digno de nota, o ATP foi descoberto posteriormente e neste momento era atribuído ao mesmo apenas um papel de regeneração dos níveis de fosfocreatina.



**Figura 1. Estrutura química das moléculas de creatina, fosfocreatina e creatinina.**

Além disso, em 1934, Lohmann postulou a reação na qual o grupo  $\gamma$ -fosfato do ATP é transferido ao grupo guanidino da creatina para formar fosfocreatina (Esquema 1) (LOHMANN, 1934). Após a descoberta do ADP, Lehmann descreveu a bem aceita reação de conversão de creatina em fosfocreatina (Esquema 2) (LEHMANN, 1936). Posteriormente, (KUBY, NODA e LARDY, 1954) identificaram e caracterizaram a enzima responsável pela fosforilação de creatina, nomeada como creatina cinase, no tecido muscular de coelhos e em seguida (NOLTMANN, MAHOWALD e KUBY, 1962) propuseram as suas propriedades cinéticas. A partir disto (JACOBUS e LEHNINGER, 1973) propuseram que o ADP produzido por alto gasto metabólico é imediatamente refosforilado a ATP através da ação da enzima creatina cinase, usando o grupamento fosfato da fosfocreatina.



**Esquema 1. Esquema representativo da ação da enzima creatina cinase proposto inicialmente por Karl Lohmann (1934).** AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato; Cr: Creatina; PCr: fosfocreatina; Pi: fosfato inorgânico.



**Esquema 2. Esquema representativo da ação da enzima creatina cinase proposto por Lehmann (1936).** ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; Cr: Creatina; PCr: fosfocreatina.

Um estudo demonstrando que a síntese de creatina também ocorria no sistema nervoso central (SNC) teve grande repercussão na comunidade científica, e assim foi proposto pela primeira vez que o tecido neuronal teria a maquinaria de síntese de creatina (DEFALCO e DAVIES, 1961). (CAIN e DAVIES, 1962) e (YANG e DUBICK, 1977) ao inibirem a enzima creatina cinase com fluorodinitrobenzeno verificaram que os níveis de creatina e fosfocreatina permaneciam constantes, enquanto que os de ATP diminuíam progressivamente até que as contrações musculares não pudessem acontecer. Além disso, um estudo posterior demonstrou que após um processo isquêmico a contração muscular cessa com uma diminuição de cerca de 20% dos níveis de ATP e com uma depleção quase total dos níveis de fosfocreatina (GUDBJARNASON, MATHES e RAVENS, 1970). Diante destes achados e da identificação das isoformas da enzima creatina cinase em compartimentos celulares distintos (mitocôndria e citosol) (BASSON, GRACE e ROBERTS, 1985). (ROBERTS e GRACE, 1980), (SAKS *et al.*, 1978) e também (BESSMAN e GEIGER, 1980) propuseram uma “lançadeira” de ATP através da interconversão de creatina em fosfocreatina. De acordo com essa hipótese, as isoenzimas mitocondrial e citosólica da creatina cinase trabalham em direções opostas e esse mecanismo será melhor detalhado nos próximos subtópicos desta tese, e assim estariam acoplando os sítios de síntese de ATP aos sítios de utilização dos mesmos.

Nos anos 90, um transportador de creatina foi identificado, caracterizado e clonado (NASH *et al.*, 1994; SORA *et al.*, 1994). Sendo assim, acredita-se que a creatina seja exocitada ao meio extracelular e captada por outras células através de tal transportador, exercendo um papel de mediador na comunicação celular.

Após as olimpíadas de 1992 em Barcelona dois medalhistas olímpicos Linford Christie e Sally Gunnell declararam fazer utilização de suplementos esportivos a base de creatina e logo a utilização deste composto se popularizou entre atletas e praticantes de exercício físico. A partir disto, diversos estudos demonstraram que a suplementação com a creatina é capaz de melhorar o desempenho físico de atletas em diversas modalidades esportivas (WILLIAMS *et al.*, 1999). Entretanto,

somente nos anos 2000 que alguns estudos começam a apontar propriedades terapêuticas da suplementação com este composto tipoguanidina em algumas doenças (ANDRES *et al.*, 2008).

### **1.1.2. Distribuição em tecidos corporais e síntese**

A creatina é um composto formado por carbono, nitrogênio e hidrogênio (PERSKY, BRAZEAU e HOCHHAUS, 2003) e distribuída nos diversos tecidos corporais de seres humanos. Estima-se que 95% da creatina corporal seja encontrada no músculo esquelético, e os 5% restantes são encontrados no cérebro, fígado, rins, e testículo (WALKER, 1979). Sabe-se que a concentração total de creatina intracelular é cerca de 120-125 mmol/kg de peso seco, resultando em 120g deste composto em um indivíduo de 70 kg (PERSKY *et al.*, 2003).

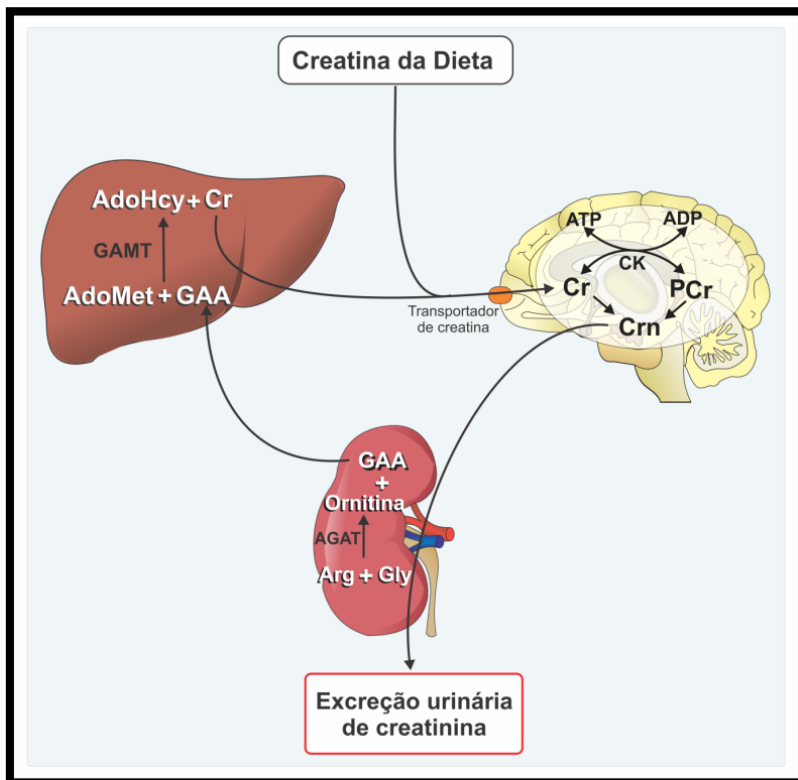
A creatina é obtida através da dieta, sendo que carnes, peixes e outros derivados animais são fontes bastante ricas em creatina (Tabela 1), ou pode ser sintetizada endogenamente, principalmente no fígado, rins e pâncreas (cerca de 1 grama é sintetizada por dia, Figura 2) (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). A biossíntese de creatina ocorre a partir dos aminoácidos L-arginina e glicina pela formação de guanidino acetato e L-ornitina em uma reação catalisada pela enzima L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT) (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Sabe-se que para o processo de síntese de creatina é necessário cerca de 14-18% de L-arginina total do organismo (CLARK, 1998). É bem estabelecido que o guanidinoacetato é sintetizado nos rins e transferido via corrente sanguínea ao fígado (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). O guanidinoacetato é então metilado formando creatina, através da enzima guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Sabe-se que 30-40% de todo o grupo metil doado por S-adenosil-L-metionina é destinado ao processo de síntese da creatina (CLARK, 1998). É válido ressaltar que as enzimas de biossíntese de creatina encontram-se expressas de forma diferenciada nos órgãos corporais. Em mamíferos o pâncreas apresenta ambas as enzimas, enquanto nos rins AGAT é extremamente expressa e GAMT é pobremente expressa. Já no fígado GAMT é bastante expressa, enquanto AGAT é pouco expressa. A distribuição destas enzimas em distintos órgãos corporais irá determinar o processo de biossíntese deste composto, em que o guanidinoacetato é sintetizado prioritariamente nos rins e então é transportado via corrente sanguínea

até o fígado aonde é metilado. A creatina recém-formada entra na corrente sanguínea e pode ser captada por células alvas, como células musculares e neuronais, através de um transportador dependente de íons cloreto e sódio, também chamado de transportador de creatina ou SLC6A8, ou por transportadores de aminoácidos (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

<b>Alimento</b>	<b>Concentração de creatina (g/kg)</b>
Arenque	6,5 – 10,0
Carne suína	5,0
Carne bovina	4,5
Salmão	4,5
Atum	4,0
Bacalhau	4,0

**Tabela 1. Concentrações de creatina em alimentos.** Pescados como arenque, salmão, atum e bacalhau, bem como carne bovina e suína são fontes extremamente ricas em creatina (adaptado de MENDES e TIRAPEGUI, 2002).

É válido ressaltar que cerca de 2 g de creatina são convertidas em creatinina, através de uma reação não enzimática, e esta por sua vez atravessa livremente a membrana celular sendo posteriormente excretada pelos rins por filtração glomerular (GREENHAFF, 1996; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).



**Figura 2. Síntese de creatina em mamíferos.** O primeiro passo da biossíntese de creatina ocorre nos rins, em que arginina e glicina são convertidas pela ação da L-arginina/glicina amidinotransferase (AGAT) em guanidinoacetato (GAA) e ornitina. Na segunda etapa o guanidinoacetato proveniente dos rins é transferido através da corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma metilação pela enzima guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), sendo então sintetizada a molécula de creatina. Esta sai do fígado através da corrente sanguínea e então chega a tecidos alvos como o músculo e cérebro. A creatina então pode ser fosforilada pela enzima creatina cinase (CK) e formar fosfocreatina. Tanto creatina quanto fosfocreatina podem ser convertidas em creatinina em uma reação espontânea não enzimática (cerca de 2% do total de creatina por dia). A creatinina é difundida para fora das células e é excretada na urina. AGAT: L-arginina-glicina amidinotransferase, Arg: arginina, CK: creatina cinase, Cr: Creatina, Crn: creatinina, GAA: Guanidinoacetato, Adohcy: S-Adenosil-Homocisteína, Adomet: S-Adenosil-L-Metionina, Arg: Arginina, GAMT: Guanidinoacetato metiltransferase, Gly: Glicina, PCR: fosfocreatina.

Entretanto, estudos tem demonstrado que o cérebro de mamíferos também pode sintetizar creatina (VAN PILSUM, STEPHENS e TAYLOR, 1972). Está sendo bem reportado que AGAT e GAMT são expressas no SNC tanto no desenvolvimento quanto na fase adulta dos indivíduos (BRAISSANT *et al.*, 2001, 2005; TACHIKAWA *et al.*, 2004, 2007). A AGAT pode ser expressa em muitos tipos celulares do SNC como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (BRAISSANT *et al.*, 2001; NAKASHIMA *et al.*, 2005). Além disso, AGAT é muito expressa em células que fazem o aporte periférico ao sistema nervoso central, por exemplo, parênquima, fluido cerebrospinal, células endoteliais de microcapilares, astrócitos que fazem contato com a barreira hematoencefálica, plexo coróide e epitélio ependimal (BRAISSANT *et al.*, 2001). Já a GAMT é expressa principalmente em astrócitos e oligodendrócitos, embora neurônios também a expressem (BRAISSANT *et al.*, 2001; TACHIKAWA *et al.*, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 2005). GAMT não é expressa em células endoteliais de microcapilares, plexo coróide, epitélio ependimal ou em astrócitos que fazem contato com a barreira hematoencefálica (BRAISSANT *et al.*, 2001; TACHIKAWA *et al.*, 2004).

### 1.1.3. Sistema de transporte

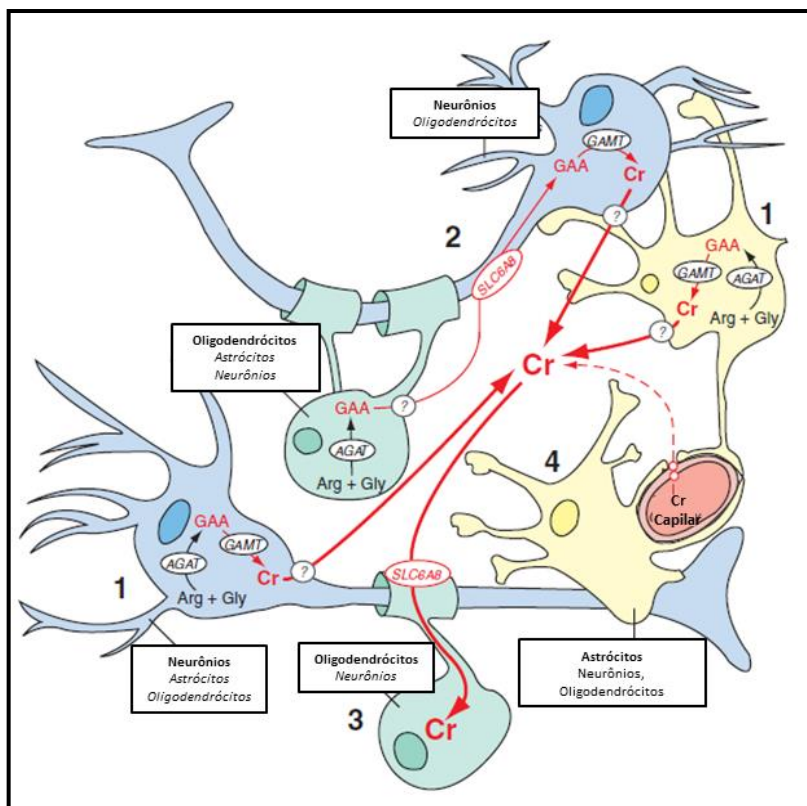
A creatina entra na corrente sanguínea por difusão e então pode ser captada de forma saturável por tecidos corporais (células sanguíneas vermelhas e brancas, músculo esquelético e cardíaco, cérebro, espermatozóides e retina) (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000), contra um gradiente de concentração através de um transportador dependente de íons cloreto e sódio, também chamado de transportador de creatina 1 ou SLC6A8, ou por um transportador de creatina 2, também conhecido como transportador de monocarboxilato, ou MCT12, ou ainda por transportador de aminoácidos (BRAISSANT *et al.*, 2010). O transportador de creatina 1 é encontrado predominantemente no encéfalo, coração, músculo esquelético, rins, fígado, placenta, retina, eritrócitos, enterócitos, baço, pâncreas, timo, pulmão, epidídimo, próstata, testículo, ovário, intestino e cólon (GUIMBAL e KILIMANN, 1994; SNOW e MURPHY, 2001), enquanto o transportador de creatina 2 é mais abundante nos rins e na retina (ABPLANALP *et al.*, 2013). O transportador de creatina 1 é da família dos transportadores de neurotransmissores dependentes de  $\text{Na}^+$ , sendo, por exemplo, da mesma família do transportador de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e do transportador de taurina (GUIMBAL e KILIMANN, 1994;

SORA *et al.*, 1994). O transporte de creatina mediado por seu transportador utiliza um sistema de cotransporte com  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ , com estequiometria de 2  $\text{Na}^+$  e 1  $\text{Cl}^-$  por molécula de creatina transportada (GARCIA-DELGADO *et al.*, 2001; PERAL *et al.*, 2002), utilizando o gradiente eletroquímico do  $\text{Na}^+$  gerado pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (GUERRERO-ONTIVEROS e WALLIMANN, 1998). Esse transportador é especulado que capte também guanidinoacetato sintetizado por outras células (BRAISSANT *et al.*, 2010).

O transportador de creatina 1 apresenta 635 resíduos de aminoácidos (~70,5 kDa) com 12 domínios transmembrana. Este transportador pode ser glicosilado ou fosforilado, apresentando três sítios de glicosilação e 5 sítios de fosforilação (NASH *et al.*, 1994). Os processos de glicosilação e fosforilação são de suma importância para a atividade de tal transportador. Vale destacar ainda que o transportador de creatina pode ser fosforilado pela proteína cinase dependente de AMPc (PKA) ou mesmo pela proteína cinase C (PKC) e assim apresenta-se em sua forma ativa, desempenhando suas respectivas funções (NASH *et al.*, 1994; SORA *et al.*, 1994; SALTARELLI *et al.*, 1996). Em relação a sua localização intracelular foi demonstrado que o mesmo encontra-se justaposto à isoforma  $\alpha_1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e à enzima citrato sintase, presentes respectivamente na membrana plasmática e na matriz mitocondrial (SNOW e MURPHY, 2001).

No SNC existem células que coexpressam AGAT e GAMT e sintetizam a molécula de creatina (principalmente neurônios), existem células que somente expressam AGAT (principalmente oligodendrócitos), sintetizando GAA e liberando-o ao espaço extracelular, também existem algumas células que somente expressam GAMT (neurônios) que captam o GAA através de SLC6A8 e assim completam a síntese de creatina, existem células ainda que expressam somente SLC6A8 e são chamadas de “utilizadoras de creatina” (principalmente oligodendrócitos), e por fim existem algumas células isentas de AGAT, GAMT e SLC6A8 (principalmente astrócitos) (Figura 3). Assim parece existir uma comunicação dos diversos tipos celulares do SNC na modulação do sistema creatina cinase/fosfocreatina.

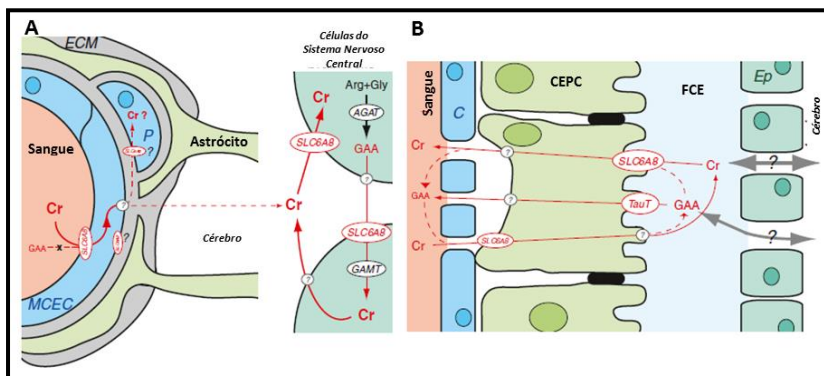




**Figura 3. Modelo de síntese e transporte de creatina no SNC.** 1) Células que coexpressam AGAT e GAMT e sintetizam a molécula de creatina (principalmente neurônios), 2) Algumas células que somente expressam AGAT (principalmente oligodendrócitos), sintetizando GAA e liberando-o ao espaço extracelular e algumas células que somente expressam GAMT (neurônios) captam o GAA através de SLC6A8 e assim completam a síntese de creatina, 3) Algumas células expressam somente SLC6A8 e são chamadas de "utilizadoras de creatina" (principalmente oligodendrócitos), 4) Algumas células isentas de AGAT, GAMT e SLC6A8 (principalmente astrócitos). AGAT: L-arginina-glicina amidinotransferase, Cr: Creatina, GAA: Guanidinoacetato, Arg: Arginina, GAMT: Guanidinoacetato metiltransferase, Gly: Glicina, SLC6A8: Transportador de creatina (Adaptado de BRAISSANT *et al.*, 2010).

As células do SNC captam a creatina da periferia através de SLC6A8 expressa nas células endoteliais de microcapilares na barreira hematoencefálica, embora a maioria dos astrócitos

(principal difusor de algumas substâncias da periferia em direção ao SNC) não apresentem o transportador de creatina. Além disso, células epiteliais do plexo coroide captam creatina da barreira hematoencefálica e do fluido cérebro-espinal. Então a creatina ou o guanidinoacetato podem ser carregados da periferia até ao fluido cérebro-espinal através do transportador de creatina ou de taurina. Em condições fisiológicas o guanidinoacetato ou creatina vão das células do epitélio endotelial até o fluido cérebro-espinal e então regressando até as células sanguíneas através das células epiteliais do plexo coróide, e assim o guanidinoacetato regressa a periferia preferencialmente através do transportador de taurina (Figura 4).



**Figura 4. Modelo de transporte de creatina e guanidinoacetato através da barreira hematoencefálica e do fluido cérebro-espinal.** A) As células do SNC captam a creatina da periferia através de SLC6A8 expressa nas células endoteliais de microcapilares (MCEC) na barreira hematoencefálica. Entretanto, os astrócitos que fazem contato com a barreira hematoencefálica não apresentam SLC6A8 dificultando a difusão da creatina ao longo da matrix extracelular (ECM). B) Células epiteliais do plexo coroide (CEPC) captam creatina da barreira hematoencefálica e do fluido cérebro-espinal (FCE). Em condições fisiológicas o guanidinoacetato (GAA) vai do fluido cérebro-espinal até as células sanguíneas através das CEPC, e assim o ácido GAA regressa a periferia preferencialmente através do transportador de taurina (TauT). AGAT: L-arginina-glicina amidinotransferase, CEPC: Células epiteliais do plexo coróide, Cr: Creatina, FCE: fluido cérebro-espinal; GAA: Guanidinoacetato, Arg: Arginina, ECM: matrix extracelular, Ep: Epitélio Ependimal, GAMT: Guanidinoacetato metiltransferase, Gly: Glicina, MCEC: Células endoteliais de microcapilares, P: Pericito, SLC6A8: Transportador de creatina, Taut: Transportador de taurina (Adaptado de BRAISSANT, 2012).

Tanto neurônios, quanto astrócitos sintetizam e captam creatina, sendo que a concentração intracelular deste composto no SNC deve-se prioritariamente a sua captação do meio extracelular, e secundariamente por sua síntese (CARDUCCI *et al.*, 2013).

#### 1.1.4. Sistema creatina cinase/fosfocreatina

É relatado que existam 3 isoformas da creatina cinase no citosol celular e estas são exclusivamente diméricas, compostas por duas subunidades M (referente à isoforma muscular) ou duas subunidades B (referente à isoforma cerebral), ou mesmo uma combinação de uma subunidade M e uma subunidade B. Assim existem as isoformas da creatina cinase citosólica diméricas BB-CK, MM-CK ou BM-CK e estas podem estar solúveis ou associadas com estruturas subcelulares (por exemplo, no retículo sarcoplasmático no músculo) (WALLIMANN, SCHLOSSER e EPPENBERGER, 1984; KRAUSE e JACOBUS, 1992; KORGE, BYRD e CAMPBELL, 1993). A creatina cinase também é encontrada na mitocôndria na forma homodimérica ou homooctamérica. Existe uma interconversão das formas octaméricas em diméricas dependendo de diversos fatores. Quando existe grande concentração da creatina cinase mitocondrial e baixo p.H, estas condições favorecem a formação da forma octamérica da creatina cinase mitocondrial. Já quando existe um equilíbrio nas concentrações de substratos (MgADP, MgATP, creatina e fosfocreatina) ou formação de um complexo análogo ao estado de transição formado por creatina cinase mitocondrial, MgADP, creatina, e nitrato observa-se uma rápida dissociação do octâmero (GROSS e WALLIMANN, 1993). Em vertebrados, existe isoformas da enzima creatina cinase mitocondrial com particularidades funcionais dependentes dos tecidos corporais aonde são encontradas. A creatina cinase mitocondrial sarcomérica é encontrada no músculo estriado, enquanto a creatina cinase mitocondrial ubíqua é encontrada no cérebro, rins e esperma (WALLIMANN e HEMMER, 1994; KALDIS *et al.*, 1996; BOERO *et al.*, 2003).

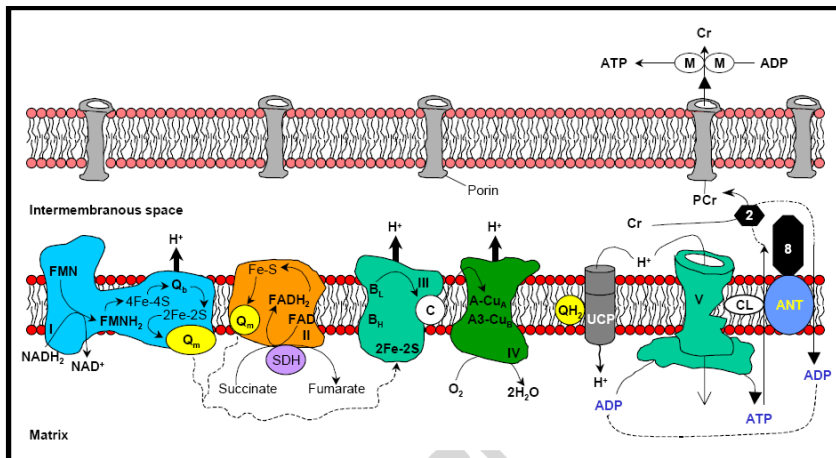
De forma geral, em tecidos alvos a creatina pode ser fosforilada pela enzima creatina cinase mitocondrial, sendo convertida a fosfocreatina com gasto de ATP nas mitocôndrias celulares e então a fosfocreatina se difunde para o citoplasma. A fosfocreatina encontra-se disponível para regeneração imediata de

ATP hidrolizado em situações de aumento de trabalho celular. O ADP gerado é reciclado pela mitocôndria na síntese de nova molécula de ATP. A alta eficiência da creatina cinase mitocondrial se deve ao fato de ela se encontrar na superfície externa da membrana mitocondrial interna acoplada através de uma força eletrostática (LIPSKAYA *et al.*, 1982; WENGER *et al.*, 1985; BROOKS e SUELTER, 1987; LIPSKAYA, GEIGER e BESSMAN, 1995), mas parece também ser encontrada na crista mitocondrial (WEGMANN *et al.*, 1991; KOTTKE, WALLIMANN e BRDICZKA, 1994). Ainda, a creatina cinase mitocondrial parece estar acoplada ao translocador de nucleotídeos de adenina. Sendo assim, o ATP sintetizado pela fosforilação oxidativa na mitocôndria chega até o sítio ativo da creatina cinase mitocondrial através do translocador de nucleotídeos de adenina, enquanto o ADP é transportado de forma contrária até os complexos da cadeia transportadora de elétrons (SAKS, KHUCHUA e KUZNETSOV, 1987; SAKS *et al.*, 1994).

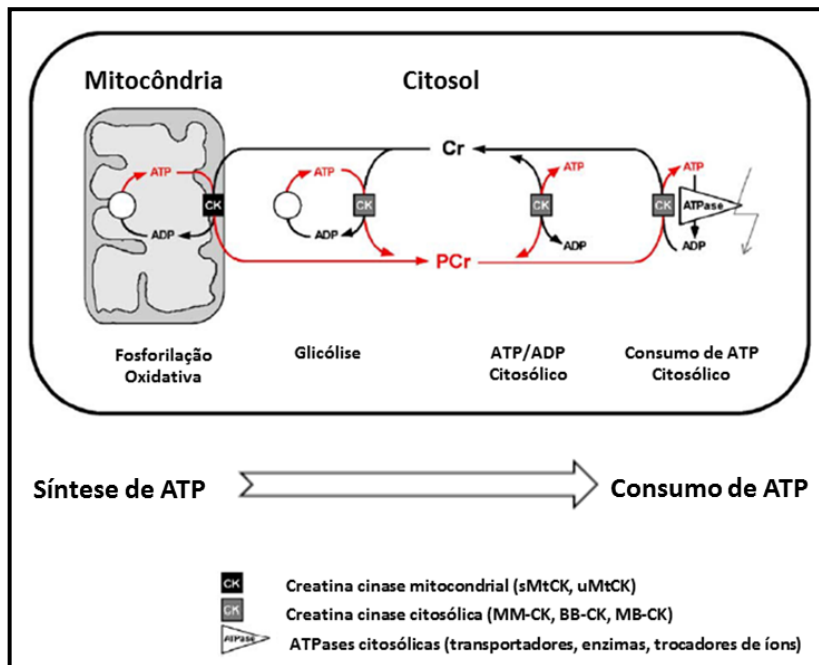
A fosfocreatina, por sua vez, pode ser reconvertida a creatina por outra isoforma da creatina cinase, presente no citosol, liberando uma molécula de ATP, sendo que a molécula de creatina formada é transportada novamente para o espaço intermembranoso mitocondrial (SAKS *et al.*, 1978; BESSMAN e GEIGER, 1980; WALLIMANN, ZURBRIGGEN e EPPENBERGER, 1985).

A conversão de creatina em fosfocreatina no interior das células faz com que a creatina seja mantida dentro da célula, visto que esta mudança molecular evita a difusão da creatina ao meio extracelular (GREENHAFF, 1996). Em casos de baixo pH ou ATP, a reação favorece a geração de ATP, enquanto que em casos nos quais se tem pH ou ATP elevado a reação favorece a formação de fosfocreatina (PERSKY e BRAZEAU, 2001).

O transporte do ATP sintetizado até os sítios de utilização deste é necessário. Assim, acredita-se que a creatina e a fosfocreatina sejam muito mais difusíveis que o ATP e o ADP, respectivamente, e isso faz com que esse sistema acople os sítios de produção de ATP aos sítios de utilização do mesmo (CLARK, 1997). Esse sistema complexo é demonstrado nas Figuras 5 e 6.



**Figura 5. Acoplamento da síntese de ATP na cadeia transportadora de elétrons e o sistema creatina cinase/fosfocreatina.** A molécula de ATP sintetizada através da cadeia transportadora de elétrons entra no espaço intermembranoso mitocondrial através de translocases (que promovem também uma liberação de ADP na matriz mitocondrial). Dentro do espaço intermembranoso o ATP doa um fosfato para a formação de fosfocreatina em uma reação catalisada pela enzima creatina cinase mitocondrial (mtCK). A fosfocreatina se difunde para o meio citosólico através de poros mitocondriais e no citosol ela é reconvertida a creatina pela ação da enzima creatina cinase citosólica (exemplificada na figura através da isoforma MM-CK) e liberando uma molécula de ATP necessária para diversos processos celulares. (2) creatina cinase mitocondrial; (8) ATP (adaptado de BAKER e TARNOPOLSKY, 2003).



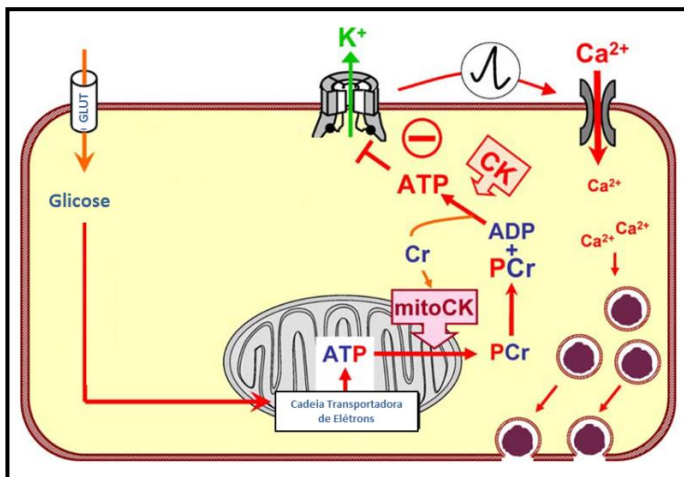
**Figura 6. Sistema creatina cinase/fosfocreatina.** As isoenzimas creatina cinase mitocondrial (sMtCK, uMtCK) e creatina cinase citosólica (MM-CK, BB-CK, MB-CK) são específicas para cada compartimento celular. Estas enzimas estão associadas com o ATP sintetizado vindo de processos metabólicos, como a fosforilação oxidativa e glicólise, e associados com o consumo de ATP em funções celulares através de ATPases. Devido ao alto poder de difusão da fosfocreatina em comparação com o ATP, este sistema apresenta um perfil de tampão energético espacial e temporal (adaptado de SCHLATTNER, TOKARSKA-SCHLATTNER e WALLIMANN, 2006).

No SNC a enzima creatina cinase ubíqua é expressa exclusivamente em neurônios, enquanto que a enzima creatina cinase BB é preferencialmente expressa em astrócitos, com baixa expressão em alguns subtipos de neurônios (LOWE *et al.*, 2013).

A creatina ou a fosfocreatina podem sofrer degradação de forma não enzimática e irreversivelmente a creatinina e esta pode ser eliminada por filtração glomerular renal (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

### 1.1.5. Creatina e neuromodulação

A creatina não está apenas envolvida no metabolismo energético, mas também parece apresentar um papel neuromodulatório no SNC. Acredita-se que a creatina seja exocitada na fenda sináptica mediante uma despolarização (como diversos neurotransmissores) por um mecanismo mediado por cálcio, inibição dos canais de potássio e ativação de canais de sódio (ALMEIDA, L. S. *et al.*, 2006). Este mecanismo de exocitose da creatina é ilustrado na Figura 7. Uma possibilidade sugerida é que a creatina possa atuar como um co-transmissor, sendo exocitada em conjunto com neurotransmissores (principalmente em vesículas glutamatérgicas e GABAérgicas) e influenciando a atividade de receptores para tais transmissores em neurônios pós-sinápticos, bem como regulando a homeostase de cálcio intracelular (ALMEIDA, L. S. *et al.*, 2006; GENIUS *et al.*, 2012). É válido ressaltar que o transportador de creatina está presente em sinaptossomas neuronais o que estaria reforçando o papel neuromodulatório da creatina (PERAL *et al.*, 2010; VAN DE KAMP *et al.*, 2013). Embora até o presente momento não existam descrições e caracterização de um receptor para creatina ou fosfocreatina, não descartamos a possibilidade destes compostos terem seus próprios receptores e assim atuarem como neurotransmissores.



**Figura 7. Mecanismo de excitose da creatina.** A creatina pode ser convertida em fosfocreatina pela creatina cinase mitocondrial. A fosfocreatina se difunde para o citosol e então pela ação da enzima creatina cinase citosólica é reconvertida a creatina, liberando ATP. O ATP exerce uma inibição dos canais de potássio, o que é repercutido em uma despolarização celular e abertura dos canais de cálcio voltagem dependente. A partir disso, os níveis de cálcio intracelular medeiam a excitose da creatina (em roxo).

#### i) *Regulação da homeostase de Cálcio*

A creatina parece ainda estimular os canais de cálcio sensíveis à voltagem e assim aumenta a permeação de cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático em miotubos (CALDERON-RIVERA *et al.*, 2012). Em vesículas de retículo sarcoplasmático isoladas foi demonstrado que o sistema creatina/creatina cinase/fosfocreatina aumenta a atividade da ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) (ROSSI *et al.*, 1990; KORGE, BYRD e CAMPBELL, 1993). Entretanto, creatina só estimula a atividade de SERCA se existir condições de alteração da funcionalidade da bomba ou depleção de fosfocreatina (KORGE, BYRD e CAMPBELL, 1993). Ainda, a creatina parece ter um importante papel na estabilização dos níveis fisiológicos de cálcio em miotubos (PULIDO *et al.*, 1998). Todas estas evidências reforçam a importância da creatina em processos correlacionados à homeostase de cálcio.



## ii) *Sistema Glutamatérgico*

Os receptores glutamatérgicos NMDA promovem uma permeação para o meio intracelular de íons cálcio e como a creatina é hábil em modular a homeostase de cálcio, têm sido postulado que a creatina poderia estar modulando as correntes de cálcio através dos receptores NMDA. Estudos reportam que a creatina inibe as correntes de cálcio induzidas por NMDA mais tapsigargina (inibidor da SERCA) em células hipocâmpais, sugerindo que a creatina atue inibindo a atividade do receptor glutamatérgico NMDA (GENIUS *et al.*, 2012).

É reportado que guanidinas interagem com o sítio de poliaminas no receptor glutamatérgico NMDA (CARTER, 1994; BERGER *et al.*, 2006). De fato, a creatina, composto tipoguanidínico, parece melhorar a memória espacial e esse efeito parece ser revertido pela administração de um antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, sugerindo que a creatina atue como agonista dos sítios das poliaminas (OLIVEIRA *et al.*, 2008). É válido ressaltar ainda que os sítios das poliaminas podem apresentar tanto efeitos inibitórios quanto estimulatórios dos receptores NMDA, dependendo dos níveis de glicina, voltagem e da composição das subunidades do receptor NMDA (WILLIAMS, CASERO e DILLEHAY, 1994; JOHNSON *et al.*, 1996).

Foi mostrado também que a creatina aumenta o *binding* de [<sup>3</sup>H] MK-801 em fatias de hipocampo de ratos, sugerindo que a incubação com creatina promova aumento da ativação dos receptores NMDA, entretanto foram utilizadas doses de creatina baixas que não promovem neuroproteção em estudos *in vitro* (ROYES *et al.*, 2008). Estudos *in vivo* e *in vitro* reforçam a hipótese de que a creatina module os receptores NMDA e demonstram que a creatina parece ser neuroprotetora diante de insultos glutamatérgicos (BREWER e WALLIMANN, 2000; JURAVLEVA *et al.*, 2003, 2005). Ainda, fosfocreatina parece induzir a uma maior captação de glutamato por vesículas (XU *et al.*, 1996). Entretanto, em algumas patologias como o transtorno de hiperatividade e deficiência de atenção, o qual apresenta aumento nos níveis de glutamato no estriado cerebral, também são encontrados aumentos nos níveis de creatina em tecidos cerebrais provavelmente devido a um mecanismo de regulação homeostática da hiperexcitabilidade glutamatérgica (CARREY *et al.*, 2007).

O influxo de cálcio por meio dos receptores glutamatérgicos NMDA leva a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Os

dados da literatura demonstram que a creatina diminuiu os níveis de óxido nítrico (ON) em *Drosophila melanogaster* (cerca de 33%) e bloqueou o aumento dos níveis de ON induzido pelo tratamento com rotenona (HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010). De acordo com esta evidência, outro estudo demonstrou que a creatina reverte o aumento dos níveis de ON induzido pelo tratamento com glutamato em cultivo de células mistas de neurônio/glia (JURAVLEVA *et al.*, 2003). Entretanto, o mesmo estudo demonstrou que o haloperidol (antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) diminui os níveis de ON e a creatina reverteu esta redução em células neuronais/gliais (JURAVLEVA *et al.*, 2003). Além disso, o tratamento *in vitro* com creatina promove um aumento na imunomarcagem de neurônios positivos para a enzima NOS neuronal (DUCRAY *et al.*, 2006). Todos estes dados da literatura sugerem que a creatina possa ter um efeito dual na síntese de ON.

#### **1.1.6. Creatina e sistema antioxidante**

A literatura vem reportando propriedade antioxidante da creatina há algumas décadas (Tabela 2). Um estudo demonstrou que a suplementação com creatina protegeu ratos da intoxicação por ácido nitropropiónico (um clássico modelo da doença de Huntington), sendo este efeito mediado pelo bloqueio da geração do radical hidroxil e de peróxinitrito (MATTHEWS *et al.*, 1998). Estudos reportam, ainda, que a creatina apresenta propriedades antioxidantes diretas, sendo capaz de sequestrar peróxinitrito e o ânion superóxido, mas não peróxido de hidrogênio e t-butil hidroperóxido, concluindo que a ação antioxidante da creatina é seletiva a grupos moleculares carregados (LAWLER *et al.*, 2002). Além disso, o precursor da creatina, a L-arginina, possui propriedades como sequestrador de ânions superóxido gerados pela via das xantinas oxidase (WASCHER *et al.*, 1997; WU e MEININGER, 2000). Assim, é postulado que a creatina apresente propriedades antioxidantes indiretas por aumentar os níveis de arginina e esta, por conseguinte, atue como um antioxidante (WASCHER *et al.*, 1997).

A creatina impede a diminuição da viabilidade celular e dos níveis de glutathiona induzidos por peróxido de hidrogênio em diversas linhagens de células como neuroblastos da medula espinal de embriões de galinha, U937, HUVEC e C2C12 (SESTILI *et al.*, 2011; SARTINI *et al.*, 2012). É digno de nota que o efeito protetor da creatina em relação ao insulto com peróxido de hidrogênio parece ser

independente da modulação das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase (SESTILI *et al.*, 2011). Um estudo demonstrou ainda que o tratamento com creatina em células C2C12 inibe a formação de espécies reativas de oxigênio induzida pelo tratamento com peróxido de hidrogênio, visto que o tratamento com creatina impede a oxidação de diclorofluoresceína (DCFH, um típico marcador de formação de espécies reativas de oxigênio) induzida pela incubação com peróxido de hidrogênio (YOUNG *et al.*, 2010). No estudo de (YOUNG *et al.*, 2010) foi demonstrado ainda que a creatina regula sistemas antioxidantes como as vias das tioredoxina e da glutathione, aumentando a expressão de tioredoxinas redutases no citoplasma e na mitocôndria (peroxiredoxina-4 e tioredoxina dependente da peróxido redutase). O efeito protetor da creatina em relação ao insulto com peróxido de hidrogênio parece ser devido à manutenção da integridade do DNA mitocondrial diante de tal estímulo oxidante, possivelmente por um mecanismo antioxidante direto (SESTILI *et al.*, 2011). Além disso, creatina é hábil em reduzir o dano ao RNA induzido por peróxido de hidrogênio, e este efeito parece ser dependente de sua ação direta como sequestrador de radicais livres (FIMOIGNARI *et al.*, 2009). Outro estudo reportou que o efeito antioxidante da creatina (diminuição de EROS) é devido a sua habilidade de regular o sistema ADP/ATP prevenindo assim a oxidação da enzima creatina cinase mitocondrial (LENZ *et al.*, 2005).

Além disso, o pré-tratamento com creatina administrada por 7 dias em ratos bloqueou os aumentos das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzido pelo tratamento com guanidinoacetato (KOLLING e WYSE, 2010). Um estudo demonstrou ainda que a suplementação com creatina por sete dias em *Drosophila melanogaster* diminui os níveis de malondialdeído e hidroperóxidos (HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010). Além disso, neste mesmo estudo foi demonstrado que a suplementação com creatina reverteu à diminuição de glutathione, o aumento da atividade da manganês superóxido dismutase e o aumento na oxidação da diclorofluoresceína induzidos por rotenona (HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010).

**Tabela 2. Principais estudos investigando alterações em relação ao estresse oxidativo induzidas pelo tratamento com creatina.**

<b>Referência</b>	<b>Efeito</b>
ZUCCHI <i>et al.</i> , 1989	A incubação com fosfocreatina em preparação de membranas microsomais de tecido cardíaco de ratos reverte completamente o aumento dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico induzidas por peróxido de hidrogênio
MATTHEWS <i>et al.</i> , 1998	Suplementação com creatina por via oral previne o aumento da geração do radical hidroxila induzido pela administração de malonato e previne o aumento da geração de peróxido nítrico induzido pela administração de ácido nitropropiónico em ratos.
SULLIVAN <i>et al.</i> , 2000	Suplementação com creatina (4 semanas) impede os aumentos de espécies reativas de oxigênio em camundongos e ratos que são submetidos ao modelo de traumatismo crânio-encefálico.
LAWLER <i>et al.</i> , 2002	A creatina em sistemas acelulares foi capaz de remover o ânion superóxido e peroxinitrito.
LENZ <i>et al.</i> , 2005	Creatina administrada de forma tópica protege da diminuição da atividade da enzima creatina cinase e do potencial de membrana mitocondrial induzidos pela incubação com peróxido de hidrogênio e exposição à irradiação ultravioleta em keratinócitos humanos.
MEYER <i>et al.</i> , 2006	Creatina impede a formação de espécies reativas de oxigênio por preservar a atividade da enzima creatina cinase mitocondrial em cultivo de neurônios corticais de ratos.
FUNCHAL <i>et al.</i> , 2006	Creatina reverte a inibição da atividade da enzima creatina cinase induzida pelo agente pró-oxidante $\alpha$ -cetoácido em cultivo de células C6.
SESTILI <i>et al.</i> , 2006	A incubação com creatina exibe ação

	citoprotetora na morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em células C2C12, U937 e HUVEC.
ROYES <i>et al.</i> , 2006	A administração de creatina em ratos é capaz de reverter os aumentos na carbonilação de proteínas e as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico induzidas pelo tratamento com o ácido metilmalônico.
GUIDI <i>et al.</i> , 2008	Creatina protege de dano oxidativo no DNA mitocondrial em células HUVEC e em sistemas acelulares.
RAKPONGSIRI e SAWANGKOON, 2008	A combinação de suplementação com creatina, reposição hormonal com estrógeno e exercício físico atenuam o estresse oxidativo (diminuição dos níveis de glutathione e da atividade da enzima glutathione peroxidase e aumento na produção de glutathione oxidada) no miocárdio de hamsters deficientes de estrógeno.
DEMINICE <i>et al.</i> , 2009	A suplementação com creatina por 5-28 dias em ratos diminuiu os níveis plasmáticos de homocisteína e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e aumentou os níveis de glutathione.
FIMOGNARI <i>et al.</i> , 2009	Creatina protege contra o dano oxidativo ao RNA de células Jurkat T induzido por peróxido de hidrogênio e doxorubicina, mas não por espermina ou SNAP.
RAMBO <i>et al.</i> , 2009	Creatina reverteu o aumento das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e a diminuição de tióis não proteicos e da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase no hipocampo de ratos intoxicados com pentilenotetrazol.
SESTILI <i>et al.</i> , 2009	Creatina impede a diminuição da viabilidade celular, dos níveis de ATP e tióis não proteicos de células C2C12 expostas ao peróxido de hidrogênio.
KINGSLEY <i>et al.</i> , 2009	A suplementação com creatina por 5 dias em indivíduos saudáveis não alterou os aumentos

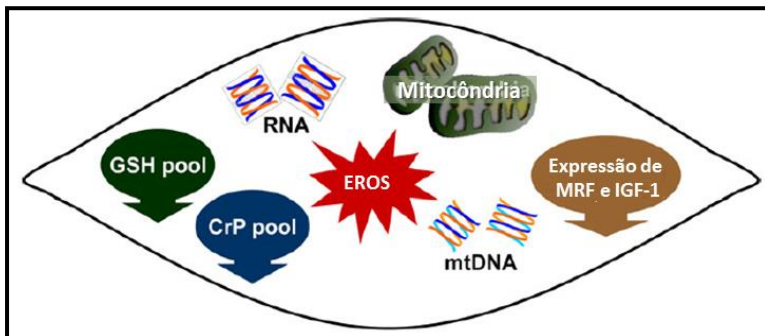
	nos níveis de hidroperóxido plasmático induzidos por testes anaeróbicos.
HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010	Creatina impede o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e da atividade da enzima manganês superóxido dismutase e a diminuição nos níveis de glutathione induzido pela toxina rotenona em <i>Drosophila melanogaster</i> .
YOUNG <i>et al.</i> , 2010	Creatina induz a expressão de enzimas antioxidantes como peroxiredoxina-4 e tioredoxina dependente de peróxido redutase em células C2C12. Além disso, a incubação com creatina reverteu a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por peróxido de hidrogênio.
KOLLING e WYSE, 2010	O pré-tratamento com creatina administrada por 7 dias em ratos bloqueou os aumentos das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico induzido pelo tratamento com guanidinoacetato.
DEMINICE <i>et al.</i> , 2011	Uma dieta rica em gordura aumentou os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado de ratos e a suplementação com creatina por 3 semanas reverteu completamente este efeito.
DEMINICE e JORDAO, 2012	Suplementação com creatina diminui os níveis de TBARS e hidroperóxido lipídico, bem como a relação glutathione oxidada/glutathione reduzida em ratos exercitados no músculo sóleo e no plasma sanguíneo.
RAHIMI, 2011	Creatina impede o aumento dos níveis de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina urinário e dos níveis de malondialdeído no plasma sanguíneo induzido por um treinamento resistido.
PERCARIO <i>et al.</i> , 2012	A suplementação com creatina quando associada a um programa de treinamento resistido promoveu um aumento nos níveis de ácido úrico sem alterar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma sanguíneo de jogadores de handebol.

SARAIVA <i>et al.</i> , 2012	Creatina diminui a carbonilação de proteínas e as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico induzido pelo traumatismo crânio-encefálico em ratos.
COCO e PERCIAVALLE, 2012	Em testes ergométricos, o tratamento com creatina impede os aumentos de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e da taxa de glutathione oxidada/glutathione reduzida.
GUIMARAES-FERREIRA <i>et al.</i> , 2012	Ratos administrados com creatina por 6 dias apresentaram redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio sem alterar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no músculo esquelético.
ALVES <i>et al.</i> , 2012	A suplementação com creatina em ratos hipertensos não diminuiu os níveis de lipoperoxidação no plasma sanguíneo, na artéria coronariana e nos tecidos cardíaco e muscular.
BERTI <i>et al.</i> , 2012	Creatina em combinação com piruvato atenuou a peroxidação lipídica provocada pela administração de fenilalanina no hipocampo de ratos.
SARTINI <i>et al.</i> , 2012	Creatina reverte à diminuição da viabilidade celular e dos níveis de glutathione induzida pela incubação com peróxido de hidrogênio em células C2C12.
ORSENIGO <i>et al.</i> , 2012	Creatina aumenta a atividade da enzima $\lambda$ -glutamyltransferase em homogenatos da mucosa do íleo de ratos e reverte a diminuição da atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase induzida pela hipóxia/reperfusão na mucosa do jejuno de ratos.
BARROS <i>et al.</i> , 2012	A suplementação com creatina por 7 dias melhorou o desempenho anaeróbico de atletas no teste de <i>wingate</i> e aumentou os níveis plasmáticos de ferro, bem como a capacidade de remoção de compostos contendo ferro. Além disso, a suplementação com creatina aumentou os níveis de ácido úrico no músculo

	dos atletas submetidos ao protocolo de exaustão energética.
DEMINICE <i>et al.</i> , 2013	A suplementação com creatina por 7 dias em atletas reverteu os aumentos nos níveis de malondialdeído e da atividade das enzimas lactato desidrogenase, catalase e superóxido dismutase induzidas por um treinamento de corrida anaeróbico (“sprint”).
SILVA <i>et al.</i> , 2013	Creatina não preveniu os aumentos nos níveis de carbonilação de proteína, superóxido, tióis e nem o aumento na atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase induzidos por um treinamento resistido excêntrico.
RAMBO <i>et al.</i> , 2013	O tratamento agudo com creatina em ratos previne a diminuição do potencial de membrana mitocondrial e o aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e da carbonilação de proteínas induzida pela administração de pentilenotetrazol.

Diante destas evidências acredita-se que a creatina possa exercer um efeito antioxidante por diminuir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por aumentar as reservas de fosfocreatina e de glutathione, por evitar o dano oxidativo no RNA e no DNA mitocondrial e por aumentar alguns fatores tróficos que poderiam mediar os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios da creatina (Figura 8) (SESTILI *et al.*, 2011).





**Figura 8.** Alvos toxicologicamente relevantes a processos de estresse oxidativo e revertidos ou atenuados pelo tratamento com creatina em células C2C12. CrP: Fosfocreatina; EROS: Espécies reativas de oxigênio; GSH: Glutathiona; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina-1; MRF: Fatores regulatórios do músculo; mtDNA: DNA mitocondrial (adaptado de SESTILI *et al.*, 2011).

### 1.1.7. Creatina e inflamação

A creatina apresenta propriedades anti-inflamatórias, sendo que atletas que fazem suplementação com este composto tipo-guanidina apresentam uma redução da inflamação muscular diante de treinos musculares vigorosos (SANTOS *et al.*, 2004; DEMINICE *et al.*, 2013). A creatina promove uma *downregulation* de receptores tipo-toll ativado por antígenos bacterianos e virais, sugerindo um efeito imunossupressor deste composto (LELAND, MCDONALD e DRESCHER, 2011). Ainda, a creatina parece inibir a permeabilidade endotelial, adesão de neutrófilos, expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, ou seja, a creatina impede o processo inflamatório mediado por células endoteliais (NOMURA *et al.*, 2003).

Ainda, BASSIT, CURI e COSTA ROSA (2008) demonstraram que a suplementação com creatina reduz os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\alpha$ ) em uma condição inflamatória (após uma competição de corrida, “ironman”). Além disso, SANTOS *et al.* (2004) demonstrou que a suplementação com creatina por 5 dias preveniu o aumento de fator de necrose tumoral- $\alpha$ , prostaglandina E<sub>2</sub> e atividade da lactato desidrogenase no músculo induzido por uma prova de corrida de 30 km. Atletas de “ironman” que suplementaram com creatina reduziram diversos

parâmetros inflamatórios plasmáticos como a atividade das enzimas lactato desidrogenase, aldolase, ácido oxaloacético glutâmico transaminase e da ácido pirúvico glutâmico transaminase (BASSIT *et al.*, 2010). Entretanto, um estudo recente demonstrou que a suplementação com creatina não reverteu os danos inflamatórios no músculo induzidos por uma contração muscular excêntrica (SILVA *et al.*, 2013).

Ainda, um estudo demonstrou que a creatina possui atividade anti-inflamatória em alguns ensaios inflamatórios, similar a muitos agentes anti-inflamatórios não esteroidais (KHANNA e MADAN, 1978; KHANNA e TAHASHILDAR, 1985). Além disso, nesse mesmo estudo a creatina apresentou atividade analgésica em ratos (KHANNA e MADAN, 1978; KHANNA e TAHASHILDAR, 1985).

#### **1.1.8. Creatina e vias de sinalização intracelular**

A creatina promove o aumento de fatores tróficos como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e isso promove a sobrevivência e proliferação de células miogênicas C2C12 (LOUIS *et al.*, 2004) e no músculo vasto lateral de indivíduos suplementados (DELDICQUE *et al.*, 2005). Acredita-se que algumas vias de sinalização intracelular estejam correlacionadas com este efeito na sobrevivência e proliferação celular induzida pela creatina, como a via de sinalização celular mediada por AKT/glicogênio sintase cinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), cinase regulada por estímulos extracelulares 1/2 (ERK1/2), P38 e cinase da proteína ribossomal S6 (P70(S6K)), desde que células C2C12 quando incubadas com creatina aumentam a fosforilação de AKT, GSK-3 $\beta$ , ERK 1/2, P38 e P70(S6K) (DELDICQUE *et al.*, 2007). Outro estudo demonstrou que a suplementação com creatina em pessoas praticantes de exercício físico aumenta a fosforilação de alvos intracelulares de mTOR, como a proteína ligante 1 do fator de iniciação eucariótico 4 (4-EBP1), no músculo vasto lateral (DELDICQUE *et al.*, 2005). Além disso, as vias de sinalização intracelular mediadas por AKT e por mTOR parecem estar envolvidas também na transcrição da enzima creatina cinase em células C2C12 estimuladas com insulina (SUMITANI *et al.*, 2002). Outro estudo demonstrou que a funcionalidade do transportador de creatina é dependente da atividade de mTOR (SHOJAIEFARD, CHRISTIE e LANG, 2006).

O efeito protetor da creatina parece ser dependente das vias de sinalização intracelular mediadas pela proteína cinase ativada por

5' adenosina monofosfato (AMPK) em células musculares esqueléticas (CEDDIA e SWEENEY, 2004).

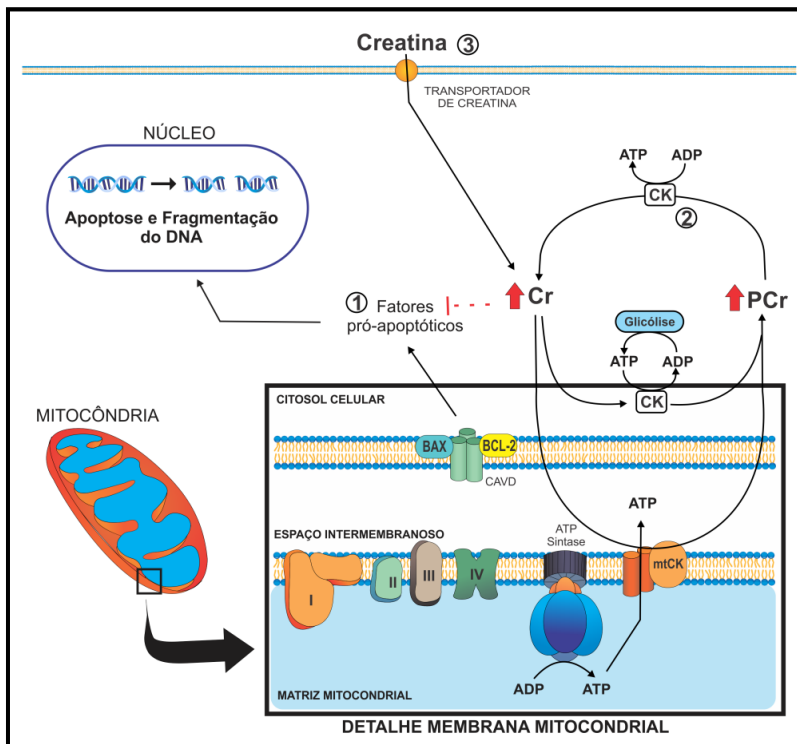
Além disso, creatina aumenta a diferenciação celular em neurônios GABAérgicos, efeito este mediado pelas vias de sinalização intracelular PI3K/AKT e MEK/ERK (ANDRES *et al.*, 2005a).

Em cultivos misto de neurônios/glia foi demonstrado que na presença de haloperidol ou glutamato, a creatina diminui a expressão de  $\kappa$ B (inibidor do fator de transcrição NF $\kappa$ B) e aumenta a sobrevivência celular, sugerindo que a ativação de genes com ação anti-apoptótica por NF $\kappa$ B é de suma importância para a sobrevivência celular induzida pela creatina (JURAVLEVA *et al.*, 2003, 2005).

Ainda, um estudo recente demonstrou que o tratamento agudo com creatina administrada intrahipocampalmente melhorou a retenção da memória espacial mediado por um aumento na atividade da proteína cinase dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-2 (CaMK-2) e da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) (SOUZA *et al.*, 2012), sugerindo que estas vias sejam extremamente importantes para as ações da creatina na memória.

### 1.1.9. Creatina e morte celular

A creatina parece prevenir processos apoptóticos e necróticos frente a diversos insultos como o peróxido de hidrogênio (SESTILI *et al.*, 2009), doxorubicina (CARETTI *et al.*, 2010; CARETTI *et al.*, 2013), ácido 3-nitropropionico (BRUSTOVETSKY, BRUSTOVETSKY e DUBINSKY, 2001), glutamato (BREWER e WALLIMANN, 2000; BRUSTOVETSKY, BRUSTOVETSKY e DUBINSKY, 2001; GENIUS *et al.*, 2012), peptídeo  $\beta$ -amilóide (BREWER e WALLIMANN, 2000), haloperidol (JURAVLEVA *et al.*, 2003), dentre outros. Além disso, um estudo demonstrou que a combinação de creatina com piruvato parece prevenir a redução de espinhos dendríticos na região CA1 do hipocampo de ratos com fenilcetonúria (DOS REIS *et al.*, 2013). Assim um mecanismo de proteção celular frente a distintos toxicantes é proposto conforme a Figura 9.

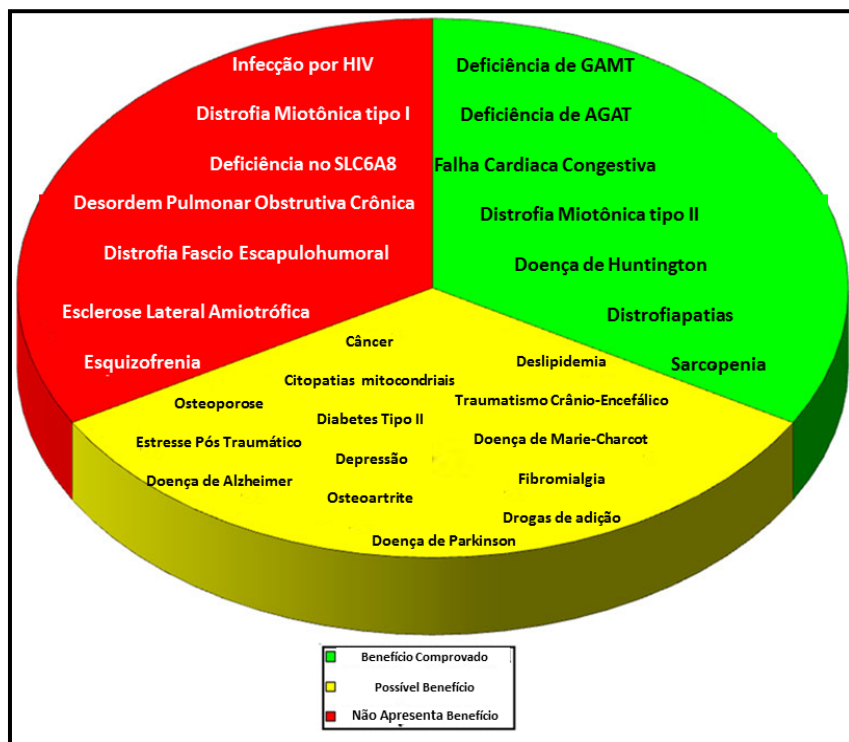


**Figura 9. Sistema creatina cinase/fosfocreatina e o papel da mitocôndria na apoptose em neurônios.** (1) A mitocôndria está intimamente ligada com a apoptose, visto que i) ela contém proteínas pró-apoptóticas que quando liberadas no citosol podem levar à morte celular por fragmentação do DNA, ii) ela produz grande parte de espécies reativas de oxigênio que podem promover danos oxidativos em lipídios, proteínas e no próprio DNA, e assim aumentam a suscetibilidade à apoptose por modular componentes do poro de transição permeável mitocondrial (mPTP). A forma octamérica da enzima creatina cinase mitocondrial parece interagir com componentes do mPTP, suprimindo a abertura deste poro e assim, diminuindo a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol, com subsequente menor fragmentação do DNA e apoptose. A suplementação com creatina mantém a forma octamérica da enzima creatina cinase mitocondrial (em oposição à forma dimérica da enzima) que inibe a abertura do mPTP. (2) O sistema creatina/creatina cinase/fosfocreatina e sua relação com processos mitocondriais: Creatina é captada por neurônios através de transportadores específicos e fosforilada à fosfocreatina pela enzima creatina cinase mitocondrial (mtCK) ou por uma forma da enzima creatina cinase citosólica. mtCK é localizada no espaço intermembranoso e acoplada à síntese de ATP, produzindo fosfocreatina e este fosfato de alta energia é exportado da organela. Além disso, existe uma

enzima creatina cinase citosólica que está acoplada à síntese de ATP pela glicólise sendo correlacionada com a manutenção de um pool de fosfocreatina. O pool de fosfocreatina é encontrado em áreas com alta demanda de ATP tais como: regiões próximas as organelas de transporte e/ou regiões aonde ocorrem sinalização intracelular dependente de ATP e/ou na membrana plasmática próximas a bombas iônicas e receptores dependentes de ATP. Nessas regiões existe uma isoforma da creatina cinase que converte fosfocreatina em creatina liberando ATP para as diversas funções celulares, nas quais este é necessário (3) Mecanismos energéticos e mitocondriais da suplementação com creatina: Creatina exógena é captada por neurônios através de transportadores específicos aumentando o pool de creatina, o qual pode estabilizar a forma octamérica da enzima CK mitocondrial e diminuir a abertura do mPTP reduzindo processos apoptóticos. A creatina pode ser fosforilada a fosfocreatina por CK mitocondrial e CK citosólica (utilizando o ATP vindo da glicólise citosólica) e assim aumenta-se o pool de PCr. A PCr pode ser transfosforilada liberando ATP para diversos processos celulares dependentes de ATP. Assim, acredita-se que o potencial neuroprotetor da suplementação com creatina deve-se a melhoras na bioenergética e função mitocondrial reduzindo a morte celular neuronal e conferindo proteção contra diversas doenças neurodegenerativas.

#### **1.1.10. Suplementação com creatina e benefícios em patologias**

Na década de 90, a suplementação com creatina ficou conhecida como um popular recurso ergogênico utilizado para melhoras em fins desportivos (BALSOM, SODERLUND e EKBLOM, 1994; MUJICA e PADILLA, 1997; JUHN e TARNOPOLSKY, 1998b; a; DEMANT e RHODES, 1999; GRAHAM e HATTON, 1999; JACOBS, 1999; KRAEMER e VOLEK, 1999; BENZI, 2000; PERSKY e BRAZEAU, 2001). Além desses efeitos sabe-se, atualmente, que a suplementação com creatina se constitui como uma estratégia efetiva no tratamento de diversas condições médicas (PERSKY e BRAZEAU, 2001). A Figura 10 mostra exemplificadamente às ações terapêuticas da suplementação com creatina em diversas patologias.



**Figura 10. Efeitos da suplementação com creatina em diversas doenças.** Em verde encontram-se as patologias nas quais a suplementação com creatina apresentou benefícios em estudos clínicos. Em amarelo estão mostradas as doenças nas quais a suplementação com creatina poderia estar minimizando ou prevenindo os sintomas de tais condições patológicas. Em vermelho estão as doenças nas quais a suplementação com creatina não demonstrou quaisquer benefícios em estudos clínicos (adaptado de GUALANO *et al.*, 2010).

### 1.1.11. Sistema creatina cinase/fosfocreatina em doenças neurológicas

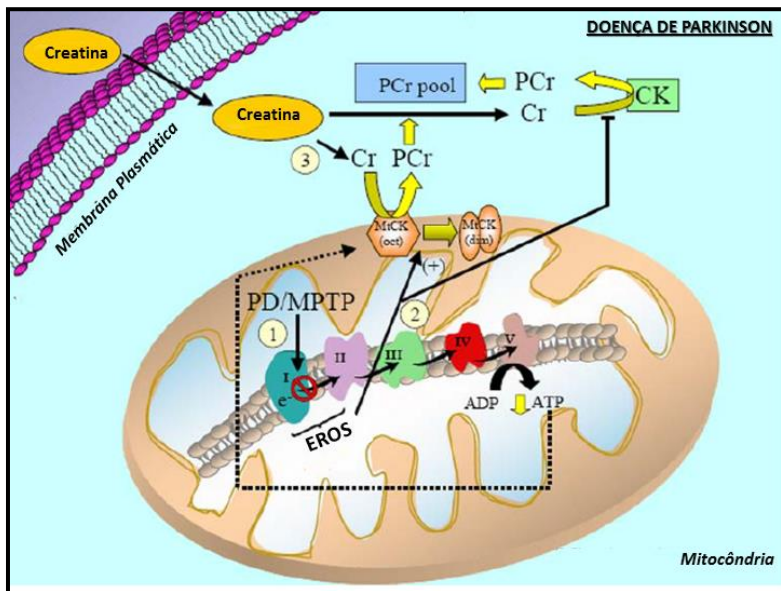
Como a creatina está envolvida na produção energética mitocondrial e atua transferindo ATP dentro da mitocôndria foi proposto que a mesma poderia ser usada em condições clínicas neurológicas e psiquiátricas nas quais o metabolismo energético mitocondrial é alterado, como é o caso da doença de Parkinson (DP) (PERSKY e BRAZEAU, 2001), doença de Alzheimer (BREWER e WALLIMANN, 2000), Huntington (BENDER *et al.*, 2005), esclerose múltipla amiotrófica (ADHIHETTY e BEAL, 2008),

isquemia cerebral (WILKEN *et al.*, 1998) e transtornos psiquiátricos (ALLEN, 2012).

i) *Doença de Parkinson (DP)*

Diversas neurotoxinas dopaminérgicas que induzem a DP, como MPTP, 6-OHDA e rotenona, alteram a função mitocondrial através de uma diminuição na atividade dos complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons e redução na síntese de ATP (GLINKA, TIPTON e YODIM, 1996; TIRMENSTEIN *et al.*, 2005; GIORDANO *et al.*, 2012). Além disso, no núcleo putâmico de pacientes com a DP foi reportado uma diminuição de fosfatos de alta energia como ATP e fosfocreatina (HATTINGEN *et al.*, 2009). Neste sentido, foi demonstrado que a creatina protege da morte neuronal dopaminérgica induzida pela toxina MPP<sup>+</sup> e por 6-OHDA em cultivo primário de células mesencefálicas (ANDRES *et al.*, 2005b). Ainda, estudos com roedores verificaram que a suplementação com creatina na dieta atenua as perdas de neurônios dopaminérgicos na substância nigra *pars compacta*, bem como a diminuição dos níveis de dopamina estriatais induzidas por MPTP (MATTHEWS *et al.*, 1999; KLIVENYI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2009). Em outro estudo foi demonstrado que a creatina reverteu a diminuição dos níveis de dopamina, o aumento de estresse oxidativo e o comportamento tipo-Parkinson induzido pela toxina rotenona em *Drosophila melanogaster* (HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010).

Os resultados obtidos com a creatina em estudos experimentais reforçaram a hipótese que a suplementação com creatina poderia ter efeitos em pacientes com a DP. Em um estudo clínico, a suplementação com creatina melhorou o humor e levou a um menor incremento de doses dos tratamentos anti-parkinsoniano ao longo do tempo em pacientes com a DP (BENDER *et al.*, 2006). Além disso, a progressão da DP foi retardada por cerca de 50% em pacientes com a DP tratados com creatina e observados por um período de um ano (NINDS NET-PD INVESTIGATORS, 2006). O National Institute of Health está conduzindo um estudo clínico em fase III para a DP, recrutando cerca de 1720 pacientes com a DP que suplementam com 10 g de creatina ou com placebo (BLOOM, 2007). Entretanto, mais evidências são necessárias para elucidar o efeito neuroprotetor da creatina em pacientes com a DP. Um esquema experimental de como o tratamento estaria trazendo benefícios a pacientes com a DP é exemplificado na Figura 11.



**Figura 11. Envolvimento mitocondrial na DP e o efeito terapêutico da suplementação com creatina.** (1) A DP é caracterizada pela inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria: Modelos animais demonstram que a administração de toxinas, como o MPTP gera inibição deste complexo, o que contribui para a patogênese da DP. Supressão ou inibição da atividade do complexo I mitocondrial leva a uma severa diminuição na produção de ATP, e consequentemente a disponibilidade desse ATP para a produção de fosfocreatina pela creatina cinase mitocondrial também é diminuída. Assim o pool de fosfocreatina é severamente diminuído. (2) Déficits na cadeia transportadora de elétrons levam a aumentos na produção de EROs que induzem uma conversão da forma octamérica da creatina cinase mitocondrial na forma dimérica (inativa). Além disso, elevadas concentrações de EROs levam a uma severa diminuição da atividade da creatina cinase citosólica. (3) Os dados da literatura reportam ações terapêuticas da creatina em modelos da DP, mas o exato mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido: A suplementação com creatina parece melhorar a bioenergética celular e a função mitocondrial por aumentar o pool de fosfocreatina e diminuir a perda neuronal induzida pela patogênese da DP. Dado o excelente desempenho da creatina como estratégia terapêutica na DP em modelos animais, alguns ensaios clínicos estão sendo conduzidos atualmente (adaptado de ADHIHETTY e BEAL, 2008).



ii) *Depressão*

Em termos pré-clínicos, foi demonstrado que uma única exposição ao estresse da natação forçada promove diminuições nos níveis de creatina e fosfocreatina no córtex pré-frontal de camundongos (KIM et al., 2010). Outro estudo também demonstrou que o estresse da natação forçada gera um aumento dos níveis de corticosterona (condição prevalente em modelos experimentais de depressão) associado a uma diminuição dos níveis de creatina no cerebelo (HERRING et al., 2008). O estresse induzido pelo desamparo aprendido promove uma robusta diminuição na expressão do transportador de creatina no hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos e o tratamento com escitalopram ou com choques eletroconvulsivos promove uma reversão deste quadro (LUGENBIEL et al., 2010). Ainda, (SARTORIUS et al., 2003) demonstraram que choques eletroconvulsivos geram alterações metabólicas no hipocampo de ratos com um significante aumento nos níveis de creatina em ratos. Um estudo demonstrou ainda que a administração aguda de cetamina e imipramina, compostos dotados de ação tipo-antidepressiva no teste do nado forçado, aumenta a atividade da enzima creatina cinase no estriado, cerebelo e córtex cerebral de ratos (ASSIS et al., 2009). O tratamento com paroxetina em ratos aumentou a atividade da enzima creatina cinase no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos (SANTOS et al., 2009). Estes achados pré-clínicos são sumarizados na Tabela 3.

**Tabela 3. Estudos que reportaram mudanças nos níveis de creatina/fosfocreatina, transportador de creatina e atividade da enzima creatina cinase em animais submetidos ao estresse e/ou antidepressivos.**

Referência	Efeito
CZEH et al., 2001	Modelo de estresse psicossocial crônico em mamíferos arborícolas, denominado de escandentes ( <i>Tupaia belangeri</i> ) diminuiu significativamente as concentrações de creatina e fosfocreatina (15%) no cérebro e a proliferação de células granulares hipocampais no giro denteado (33%).

SARTORIUS <i>et al.</i> , 2003	Níveis de creatina foram aumentados no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de desamparo aprendido e tratados com choques eletroconvulsivos.
HERRING <i>et al.</i> , 2008	O estresse da natação forçada aumentou os níveis de corticosterona e diminuiu os níveis de creatina no cerebelo de ratos.
AGOSTINHO <i>et al.</i> , 2009	A administração aguda de fluoxetina em ratos inibiu a atividade da enzima creatina cinase no cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex cerebral.
ASSIS <i>et al.</i> , 2009	A administração de cetamina e imipramina diminuíram o tempo de imobilidade no TNF e aumentaram a atividade da enzima creatina cinase no estriado, córtex cerebral e cerebelo de ratos.
SANTOS <i>et al.</i> , 2009	A administração crônica de paroxetina (ISRS) aumentou a atividade da enzima creatina cinase no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos.
KIM <i>et al.</i> , 2010	Uma simples exposição ao estresse da natação forçada diminuiu os níveis de creatina e fosfocreatina no córtex prefrontal de camundongos.
KNOX <i>et al.</i> , 2010	Ratos sujeitos a um único estresse prolongado mostraram redução dos níveis de creatina no córtex pré-frontal.
LUGENBIEL <i>et al.</i> , 2010	Ratos geneticamente selecionados com um perfil de desamparo aprendido apresentaram uma diminuição nos níveis do transportador de creatina no hipocampo e o tratamento com escitalopram reverteu esta alteração. Além disso, escitalopram e choques eletroconvulsivos aumentaram os níveis do transportador de creatina no córtex pré-frontal dos animais com predisposição ao desamparo aprendido.

ABELAIRA <i>et al.</i> , 2011	A administração crônica com imipramina e lamotrigina diminuiu o tempo de imobilidade no TNF e aumentou a atividade da enzima creatina cinase no hipocampo de ratos.
DELLA <i>et al.</i> , 2012	O tratamento agudo com tianeptina aumentou a atividade da enzima creatina cinase no córtex pré-frontal e o tratamento crônico com este antidepressivo aumentou a atividade desta enzima no hipocampo de ratos.
REUS <i>et al.</i> , 2012a	Depois do tratamento crônico e agudo com harmina, um composto com propriedade antidepressiva, foi observado um aumento na atividade da enzima creatina cinase no córtex pré-frontal e estriado de ratos.
REUS <i>et al.</i> , 2012b	A administração aguda e crônica de memantina, um composto com efeito antidepressivo, aumentou a atividade da enzima creatina cinase no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos.

Diversos estudos clínicos têm demonstrado alterações nas concentrações de creatina e fosfocreatina em diversas regiões encefálicas de pacientes depressivos (Tabela 4). Os níveis do precursor de creatina S-adenosil-L-metionina encontram-se reduzidos no fluido espinal de pacientes depressivos (BOTTIGLIERI *et al.*, 1990).

Digno de nota, a atividade da enzima creatina cinase no soro sanguíneo encontra-se reduzida em pacientes com depressão (SORA, NISHIMON e OTSUKI, 1986), tendo sua atividade dependente do subtipo do transtorno depressivo (SEGAL *et al.*, 2007). Todas estas evidências reforçam o importante papel deste sistema energético na fisiopatologia da depressão.

**Tabela 4. Principais estudos demonstrando alterações dos níveis de creatina e fosfocreatina em estruturas encefálicas e a atividade da enzima creatina cinase no sangue de pacientes depressivos.**

<b>Referência</b>	<b>Efeito</b>
SORA, NISHIMON E OTSUKI, 1986	Pacientes com depressão mostraram uma diminuição na atividade da enzima creatina cinase sérica.
BALAITA <i>et al.</i> , 1990	A atividade da enzima creatina cinase foi aumentada no plasma de pacientes depressivos.
KATO <i>et al.</i> , 1992	O estudo reportou uma significativa diminuição nos níveis de fosfocreatina em pacientes com depressão severa.
GRUBER <i>et al.</i> , 2003	Foram encontrados aumentos nos níveis de creatina no lobo frontal de pacientes depressivos.
MICHAEL <i>et al.</i> , 2003	Não foram encontradas alterações nos níveis de creatina no córtex pré-frontal dorsolateral em relação ao grupo controle, entretanto foi detectada uma correlação negativa entre a severidade da depressão com os níveis de creatina.
DAGER <i>et al.</i> , 2004	O estudo reportou uma correlação inversa entre a severidade da depressão e os níveis de creatina substância branca cerebral.
MIRZA <i>et al.</i> , 2006	Foram detectados diminuições nos níveis de creatina no córtex cingulado anterior, mas não no córtex occipital, em pacientes depressivos.
GABBAY <i>et al.</i> , 2007	Foram detectados aumentos nos níveis de creatina no caudado, putâmen e tálamo em pacientes com depressão maior em relação ao grupo controle.
SEGAL <i>et al.</i> , 2007	Pacientes depressivos não psicóticos apresentaram um aumento significativo nos escores de depressão da escala de Hamilton e uma diminuição na

	atividade da enzima creatina cinase sérica, comparado com pacientes depressivos não psicóticos.
VENKATRAMAN <i>et al.</i> , 2009	Níveis reduzidos de creatina no córtex pré-frontal medial foram encontrados em pacientes com depressão em relação ao grupo controle.
NERY <i>et al.</i> , 2009	Em pacientes depressivos homens foram encontrados uma diminuição dos níveis de creatina no córtex pré-frontal dorsolateral. Em pacientes depressivos mulheres foi encontrado aumento nos níveis de creatina nas mesmas áreas cerebrais.
FEIER <i>et al.</i> , 2011	Nenhuma alteração na atividade da enzima creatina cinase sérica entre pacientes depressivos e o grupo controle foi verificada, embora a atividade da enzima creatina cinase está aumentada em pacientes maníacos em relação aos pacientes depressivos.

Ainda, estudos pré-clínicos tem demonstrado que a suplementação com creatina em ratos diminui o tempo de imobilidade e aumenta o tempo de natação, efeito considerado tipo-antidepressivo no teste do nado forçado que parece ser mediado pelo sistema serotoninérgico (ALLEN *et al.*, 2010). Outro estudo demonstrou que a suplementação com creatina é hábil em potenciar o efeito tipo-antidepressivo do ISRS fluoxetina (ALLEN *et al.*, 2012). Ainda, um estudo demonstrou que a S-adenosil-L-metionina apresenta efeito tipo-antidepressivo no TNF (CZYRAK *et al.*, 1992).

Além disso, estudos demonstram a eficácia antidepressiva da suplementação com creatina como *augmentator* (potenciador) do efeito dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) na depressão refratária ao tratamento com antidepressivos convencionais (KONDO *et al.*, 2011; LYOO *et al.*, 2012). Ainda a suplementação com creatina tem demonstrado melhoras nos sintomas de pacientes que sofrem de estresse pós-traumático, depressão e fibromialgia (AMITAL *et al.*, 2006) e em pacientes com depressão unipolar resistentes ao tratamento com

antidepressivos (ROITMAN *et al.*, 2007). Ainda, S-adenosil-L-metionina, um doador do grupo metil para a síntese de creatina, também apresenta efeito antidepressivo (PAPAKOSTAS, 2009) e aumenta os níveis de fosfocreatina (SILVERI *et al.*, 2003). Os principais estudos investigando o efeito antidepressivo da suplementação com creatina em pacientes depressivos estão descritos detalhadamente na Tabela 5.

**Tabela 5. Principais estudos investigando o efeito antidepressivo da suplementação com creatina em pacientes depressivos.**

Referência	Efeito
AMITAL <i>et al.</i> , 2006	Uma paciente mulher com estresse pós-traumático, depressão e fibromialgia resistente ao tratamento com o antidepressivo citalopram (40 mg/kg), por 1 ano, quando suplementada com creatina monohidratada (5 gramas/dia) por 4 semanas apresentou uma redução nos escores da escala de depressão de Hamilton.
ROITMAN <i>et al.</i> , 2007	Cinco pacientes homens e 3 pacientes mulheres com depressão unipolar resistente ao tratamento com antidepressivos de distintas classes, por 4 semanas, quando suplementadas com creatina monohidratada (5 gramas/dia) por 1-4 semanas apresentam redução significativa dos escores da escala de depressão de Hamilton.
KONDO <i>et al.</i> ,	Cinco adolescentes do sexo feminino com depressão unipolar resistente ao tratamento com fluoxetina, quando suplementadas com creatina monohidratada (4 gramas/dia) por 1-8 semanas reduziram significativamente os escores da escala de depressão em crianças.
LYOO <i>et al.</i> , 2012	Cinquenta e duas pacientes mulheres com depressão unipolar tratadas com o ISRS citalopram e suplementadas com creatina monohidratada (3 gramas/dia) por 2-8 semanas apresentam redução significativa nos escores da escala de depressão de Hamilton.

NEMETS e LEVINE, 2013	Quatorze pacientes mulheres e quatro pacientes homens com depressão unipolar resistente ao tratamento com antidepressivos de distintas classes, por 3 semanas, quando suplementadas com creatina monohidratada (5-10 gramas/dia) e antidepressivos de distintas classes (ISRS, inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN) e antagonistas de receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos) por 3 semanas não apresentaram redução significativa dos escores da escala de depressão de Hamilton, em relação ao grupo placebo. Entretanto, duas pacientes apresentaram uma redução de 50% dos escores de depressão após 2 semanas de suplementação com creatina, ao contrário do grupo placebo.
-----------------------	---

#### 1.1.12. Efeitos adversos

A suplementação com creatina é geralmente considerada bem tolerada por humanos e animais. Nenhum efeito adverso da suplementação com creatina (0,8 g/kg, diariamente, por dois anos) foi demonstrado em pacientes com alteração gênica que predispõem a uma deficiência na síntese de creatina (BRAISSANT e HENRY, 2008). Além disso, um estudo demonstrou que a suplementação com creatina (1-20 g/dia, por cinco anos) foi bem tolerada por atletas saudáveis (POORTMANS e FRANCAUX, 1999). Entretanto, alguns relatos empíricos relatam ligeiros efeitos adversos da suplementação com creatina. A maioria destes estudos relata que os grandes efeitos adversos da suplementação com creatina seriam ganho de peso corporal, estresse gastrointestinal, disfunção renal e desidratação. Os especialistas em geral concordam que não há provas científicas suficientes demonstrando que a suplementação com 5 g/dia de creatina seja segura e efetiva para adultos saudáveis, entretanto também não existem provas suficientes para fazer uma recomendação em favor ou contra doses superiores ou inferiores a 5 g/dia de creatina (SHAO e HATHCOCK, 2006).





## Capítulo 1

*Efeito antidepressivo do tratamento agudo com creatina: Envolvimento de sistemas de neurotransmissão e vias de sinalização intracelular.*

Os resultados deste capítulo geraram as seguintes publicações:

- 1) Cunha MP, Machado DG, Capra JC, Jacinto J, Bettio LE, Rodrigues ALS. Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. *J Psychopharmacol.* 26(11):1489-501, 2012.
- 2) Cunha MP, Pazini FL, Oliveira A, Bettio LE, Rosa JM, Machado DG, Rodrigues ALS. The activation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 44C:39-50, 2013.
- 3) Cunha MP, Pazini FL, Oliveira A, Machado DG, Rodrigues ALS. Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. *Brain Res Bull.* 95: 61-69, 2013.
- 4) Cunha MP, Pazini FL, Oliveira A, Ludka FK, Rosa JM; Budni J, Bettio LEB, Martín-de-Saavedra MD, López MG, Tasca CI, Rodrigues ALS. The modulation of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide pathway is involved in the antidepressant-like effect of creatine. (Artigo submetido à *Psychopharmacology*).
- 5) Cunha MP, Budni J, Pazini FL, Oliveira A, Rosa JM; Rodrigues ALS. A pivotal role of PKA, PKC, CaMK-II and MEK1/2 on the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. (Artigo submetido à *Pharmacological Reports*).
- 6) Cunha MP, Budni J, Ludka FK, Pazini FL, Oliveira A, Rosa JM; Bettio LEB, Martín-de-Saavedra MD, López MG, Tasca CI, Rodrigues ALS. The PI3K/AKT signaling pathway and its downstream intracellular targets are involved in the antidepressant-like effect of creatine. (Artigo em fase de preparação).

*Ciência é tanto um modo de pensar sobre o mundo natural, como a soma das teorias e informações que resultam de tal pensamento (David L. Nelson e Michael M. Cox)*



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. DEPRESSÃO**

### **1.1.1. Histórico**

A depressão vem sendo descrita há alguns milhares de anos. Os primeiros registros de que se tem notícia sobre portadores de doenças psiquiátricas remontam há quase mil anos antes de Cristo. No texto bíblico do livro I de Samuel, no século IX a.C., aparece o relato do suicídio do rei Saul, que teria sido punido por Deus e destituído do trono, pelo seu pai, após ter tomado algumas decisões erradas como soberano. Rebelando-se contra a sua punição, o rei Saul passou a ignorar o seu pai e a Deus, que teria incumbido vários demônios a assediar Saul, através de fortes dores e uma tristeza profunda (ESTEVES e GALVAN, 2006; VIEIRA, 2008).

Já o escritor grego Homero, em sua clássica obra “Ilíada”, escrita no século VIII a.C., relata o sofrimento espiritual e o suicídio de Ajax, um dos mais fortes e habilidosos guerreiros gregos. A Ilíada é um poema épico e mitológico, que narra os acontecimentos dos últimos 50 dias do último ano da Guerra de Tróia. Ajax, num acesso de loucura, teria degolado o rebanho de ovelhas dos próprios gregos, pensando, na verdade, estar matando o rebanho dos troianos. Exprimindo sentimentos inequívocos de fraqueza e culpa Ajax resolveu acabar com sua própria vida (ESTEVES e GALVAN, 2006; VIEIRA, 2008).

Hipócrates, por volta de 400 anos antes de Cristo, em seu tratado “A Natureza do Homem” descreveu a teoria dos quatro humores corporais (sangue, fleugma ou ptuíta, bÍlis amarela, e bÍlis negra). Quando algum desses fluidos se acumulava, um “temperamento” específico se sobressaía e o resultado poderia ser o aparecimento de uma doença. Hipócrates descreveu, ainda, que o desequilíbrio do humor “bÍlis negra” estaria associado a um estado de melancolia. A palavra melancolia é derivada do grego melas (negro) e kholé (bile) que corresponde à transliteração latina melaina-kole (TEIXEIRA, 2005). Nesta perspectiva, Hipócrates definia melancolia como a “perda do amor pela vida, uma situação na qual a pessoa aspira à morte como se fosse uma bênção” (GONÇALES e MACHADO, 2007).

Os tratamentos para este desequilíbrio humoral eram através de prescrições quando necessárias de ar fresco, massagens, ginástica, eméticos, purgativos e sangrias visando

eliminar o humor excedente através das fezes, suor e sangue. Além disso, Hipócrates deixava explícito a sua crença no poder do diálogo como coadjuvante no processo de cura dos pacientes (GONÇALES e MACHADO, 2007). Em sequência, Galeno difunde as idéias hipocráticas e postula a existência de dois tipos de bÍlis negra, uma natural e outra não natural, sendo que a melancolia era decorrente de um desequilÍbrio da bÍlis negra não natural. A partir disto, diversos escritores de origem galênica, como Oribésius de Pergamon, Alexandre de Tralles e Paulo de Aegina, e escritores de origem árabe como Constantinus Africanus e Avicenne, descrevem a melancolia de acordo com suas tradições (WONG e LICINIO, 2001; CORDÁS, 2002).

Entretanto, apenas em 1854, é que foram descritos, pelos médicos franceses Falret e Baillarger, os primeiros diagnósticos formais dos episódios alternantes de mania e depressão como uma doença única, através dos termos *Folie Circulaire* (“loucura circular”) e *Folie Doublé Forme* (“loucura de forma dupla”) (DUBOVISKY e DUBOVISKY, 2004). Ainda, a depressão só foi referida como um transtorno, em 1893, por Emil Kraepelin, no seu sistema nosológico de classificação de transtornos psiquiátricos (WONG e LICINIO, 2001).

Além disso, somente em 1950 que são postuladas as primeiras estratégias farmacológicas antidepressivas baseando-se em diversos relatos científicos (WONG e LICINIO, 2001). Uma destes relatos científicos foi que a reserpina, utilizada geralmente para o tratamento de hipertensão arterial e que causa a depleção das aminas biogênicas, causava como efeito secundário a depressão maior, sendo que o tratamento com o precursor de dopamina e noradrenalina (NA), L-DOPA, revertia este efeito em animais e em humanos (LICINIO, MASTRONARDI e WONG, 2007).

Em 1953, foi postulado que a iproniazida, fármaco utilizado inicialmente para o tratamento de tuberculose, cujo mecanismo de ação seja uma inibição da enzima monoamina oxidase (enzima responsável pela degradação das monoaminas serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina) melhorava o humor de pacientes depressivos (NESTLER *et al.*, 2002). Nas décadas seguintes, os psicofarmacólogos, trabalhando em conjunto com os psiquiatras, desenvolveram outros inibidores da enzima monoamina oxidase para o tratamento da depressão, como a maclobemida e a tranilcipromina. Em 1954, o psiquiatra

suíço Roland Kuhn, descobriu então o efeito da imipramina, que não tinha os efeitos colaterais da iproniazida (estimulação excessiva, euforia e hepatotoxicidade), e era efetiva em 60% dos casos de depressão (KUHN, 1958; BOSSONG, 2008). Rapidamente a empresa Geigy colocou a imipramina no mercado, obtendo grande adesão ao seu uso. A imipramina, pela sua estrutura química, ficou conhecida como um antidepressivo tricíclico. E outros antidepressivos tricíclicos foram descobertos e comercializados, como amitriptilina, clomipramina, dentre outros. Embora estes últimos estejam disponíveis no mercado, são pouco usados atualmente. Em 1970, o neurofarmacologista americano David Wong demonstrou que existiam alguns fármacos, da classe das butirofenonas, as quais agiam quase que especificamente sobre o metabolismo da 5-HT e estes achados revolucionaram o tratamento dos transtornos de humor. Wong descobriu substâncias que inibiam seletivamente a recaptação da 5-HT no encéfalo apresentavam um potencial terapêutico em transtornos depressivos. Desde então têm sido postulado que a depressão possa estar intimamente correlacionada com uma desregulação monoaminérgica (WONG e LICINIO, 2001). Contudo, novos alvos moleculares estão sendo propostos na tentativa de encontrar estratégias terapêuticas mais eficazes para esta doença, bem como a compreensão da fisiopatologia da doença.

### **1.1.2. Prevalência**

Os transtornos psiquiátricos afetam aproximadamente 450 milhões de pessoas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), sendo que a depressão maior representa um dos distúrbios psiquiátricos mais prevalentes na população. Segundo MORENO, DIAS e MORENO (2007), a prevalência da depressão ao longo da vida na população em geral varia de 4,9% a 17,1%. Aproximadamente, um em cada seis homens, e uma em cada quatro mulheres irão passar por um episódio de depressão ao longo da vida (WITTCHEN, KNAUPER e KESSLER, 1994).

No Brasil, estima-se que 3% da população sofra com transtornos mentais persistentes e severos, 10% com transtornos mentais leves, e 11,2% com problemas decorrentes do abuso de álcool e das drogas (BRASIL, 2006). Assim no Brasil, de acordo

com dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) de 2008 realizada pelo ministério da saúde em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e com a FIOCRUZ, parece existir 17 milhões de pessoas acometidas com depressão, sendo que este transtorno apresenta uma prevalência global de 4,1% da população (NARDI, 2006; IBGE, 2010).

A prevalência desta doença depende das regiões do país no qual foram realizados os diagnósticos para tal doença. Um estudo realizado por (ALMEIDA-FILHO *et al.*, 1997) mostrou, por exemplo, que a prevalência global da depressão e da mania/ciclotimia em três capitais brasileiras varia consideravelmente. As prevalências foram, respectivamente, de 1,5% e 0,3% em Brasília, de 1,3% e 0,2% em São Paulo e de 6,7% e 1,0% em Porto Alegre.

Os transtornos depressivos apresentam uma alta taxa de recorrência. Sabe-se que após o primeiro episódio existe uma alta incidência de episódios depressivos subsequentes, sendo que a tendência chega a 50% após o primeiro episódio e após dois episódios a taxa sobe para 80% (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Esta doença acarreta perda considerável de produtividade e qualidade de vida, e déficits no relacionamento social (NEMEROFF e OWENS, 2002; PAEZ-PEREDA, 2005). Estima-se que a depressão será a segunda maior causa de incapacidade até 2020, ficando atrás apenas das doenças isquêmicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009; PITCHOT *et al.*, 2010). A depressão gera um alto desgaste pessoal e familiar e um alto custo aos cofres públicos, sendo considerado um importante problema de saúde pública (SPIEGEL, 1996). Além disso, o índice de suicídio chega a ser vinte vezes maior em pacientes depressivos em relação à população em geral.

### **1.1.3. Caracterização, sintomas e diagnóstico**

A literatura médica da primeira década dos anos 2000 enquadrou a depressão no grupo dos transtornos mentais do humor (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Como a depressão ainda não apresenta uma etiologia totalmente definida, a utilização do termo transtorno parece ser mais adequada do que síndrome. O termo transtorno sugere a existência de grupos de sintomas ou comportamentos clinicamente identificáveis, embora

sem completo entendimento da doença, e já o termo síndrome sugere um vasto conhecimento de sintomas e mecanismos envolvidos no processo patológico (NARDI, 2006). Os transtornos do humor são atualmente classificados em dois grandes grupos: os transtornos depressivos e os transtornos bipolares. Apesar destes transtornos compartilharem alguns sintomas, as evidências científicas demonstram que estes são grupos diferentes de transtornos do humor, sendo, portanto, necessário considerá-los em separado. O transtorno bipolar se diferencia da depressão por ser caracterizado por episódios de depressão, mania ou hipomania de forma isolada ou mista (SHASTRY, 2005).

Para o correto diagnóstico da depressão, os médicos contam atualmente com o auxílio de manuais específicos de Saúde Mental, tais como os já citados “Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais – 4ª edição revisada” (DSM-IV-TR) e a “Classificação Internacional de Doenças” (CID-10). Esses manuais sugerem diagnosticar o transtorno depressivo com base em uma escala de sintomas, segundo critérios clínicos neles apontados (LEITE *et al.*, 2006). Estes critérios de avaliação estão descritos na tabela 6.

**Tabela 6. Sintomas dos transtornos depressivos segundo o DSM-IV-TR e o CID-10.**

<b>SINTOMAS DA DEPRESSÃO</b>
<b>Humor deprimido na maior parte do tempo</b>
<b>Diminuição marcante no prazer em todas, ou quase todas, atividades cotidianas (anedonia)</b>
<b>Aumento ou diminuição marcante no peso ou apetite</b>
<b>Insônia ou Hipersônia</b>
<b>Agitação ou retardo psicomotor</b>
<b>Fadiga ou falta de energia</b>
<b>Sentimentos de culpa ou desvalia excessivos</b>
<b>Diminuição na capacidade de concentração e pensamento</b>
<b>Indecisão</b>
<b>Pensamentos recorrentes de morte ou ideação e tentativa suicida</b>

\* Para um paciente ser considerado depressivo ele deve apresentar no mínimo um dos sintomas em vermelho e totalizar ao menos cinco sintomas por um período mínimo de duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

#### **1.1.4. Sistemas de neurotransmissão envolvidos na fisiopatologia da depressão**

##### *i) Monoaminérgico*

Existe um consenso geral de que a depressão pode resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos. Fortes evidências sugerem uma associação da fisiopatologia da depressão com anormalidades no sistema monoaminérgico, particularmente os mecanismos noradrenérgicos e serotoninérgicos. Esta hipótese monoaminérgica sugere que a depressão é resultante de uma deficiência de 5-HT e/ou NA ou mesmo de receptores de tais neurotransmissores ineficientes (SCHILDKRAUT, 1965; COPPEN, 1967; WONG e LICINIO, 2001).

##### *a) Serotonina (5-HT) e Depressão*

Pacientes com depressão apresentam baixos níveis plasmáticos de 5-HT (COPPEN e DOOGAN, 1988) e suicidas apresentam uma redução significativa do metabólito de 5-HT, o ácido 5-hidroxiindolacético (RICCI e WELLMAN, 1990). Os receptores de 5-HT também têm sido alvo de intensas pesquisas nas últimas décadas



(ORJALES *et al.*, 1995), uma vez que muitos fármacos efetivos no tratamento da depressão agem como agonistas ou antagonistas de subtipos de receptores serotoninérgicos (JENCK *et al.*, 1994). Em particular, a ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico e de 5-HT<sub>2</sub> induz alterações comportamentais similares as promovidas por antidepressivos convencionais (LUCKI, 1991; CELADA *et al.*, 2004).

*b) Noradrenalina (NA) e depressão*

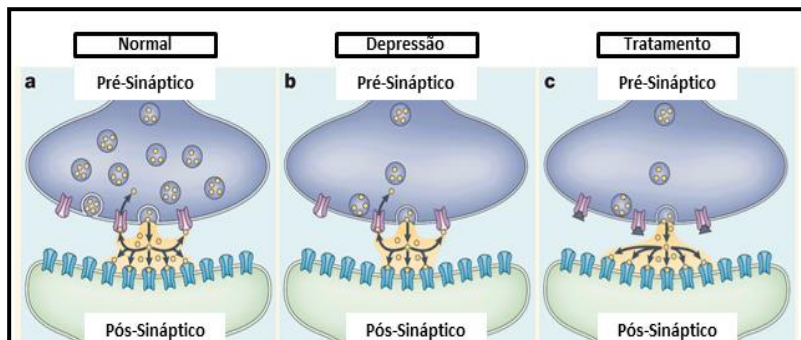
A depressão atípica, comumente associada com sintomas de letargia, fadiga, hiperfagia, hypersônia e hiperreatividade ao ambiente, está sendo correlacionada com uma disfunção hiponoradrenérgica. Já a depressão melancólica que apresenta como sintomas a hiperatividade frente ao estresse, ansiedade, perda da reatividade em relação ao ambiente, insônia e perda de apetite, está sendo associada com condições hipernoradrenérgicas (GOLD e CHROUSOS, 2002). A ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos está sendo implicadas na ação de antidepressivos (SVENSSON, 1984). Além disso, um estudo sugere que a ativação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos melhora a plasticidade sináptica, função cognitiva e humor (DOZE *et al.*, 2011). Ainda, pacientes depressivos parecem ter menor densidade de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (GURGUIS *et al.*, 1999). Outros estudos em ratos demonstram que o efeito comportamental do tratamento crônico com reboxetina em ratos está correlacionado com sua capacidade de dessensibilizar os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (PARINI *et al.*, 2005). Além disso, a maioria dos agentes farmacológicos com ação antidepressiva, incluindo os inibidores da enzima monoamina oxidase, antidepressivos tricíclicos, ISRS e os ISRN, aumentam os níveis sinápticos de NA e 5-HT (RISCH e NEMEROFF, 1992; RICHELSON, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005).

*c) Dopamina e Depressão*

Estudos clínicos e pré-clínicos indicam ainda que o sistema dopaminérgico está fortemente envolvido com a regulação do humor, uma vez que várias evidências correlacionam anormalidades na neurotransmissão dopaminérgica com a fisiopatologia da depressão (D'AQUILA *et al.*, 2000). Assim sendo, tem sido observada uma diminuição do metabólito de dopamina, ácido homovalínico, no líquido de pacientes depressivos e em várias regiões do cérebro que

modulam o humor (BROWN e GERSHON, 1993; PAPAKOSTAS, 2006). Ainda estudos indicam que antidepressivos clássicos ativam o sistema dopaminérgico (WAEHRENS e GERLACH, 1981; PAPAKOSTAS, 2006). Ainda, fármacos que modulam o sistema dopaminérgico, como o inibidor da recaptação de dopamina bupropiona, apresentam efeito antidepressivo na clínica e em modelos animais (CUNHA *et al.*, 2008; ISHAK *et al.*, 2009).

Todas as evidências reportadas reforçam a hipótese monoaminérgica (Figura 12), entretanto esta apresenta algumas limitações. Esta hipótese não explica, por exemplo, o fato de que alguns agentes com propriedade antidepressiva não agirem sobre o sistema monoaminérgico e que nem toda droga que aumenta as monoaminas na fenda sináptica apresenta propriedades antidepressiva (como por exemplo, a cocaína e a anfetamina) (STAHL, 1994; STAHL, 2000). Além disso, drogas antidepressivas aumentam os níveis de monoaminas agudamente, entretanto o efeito clínico na remissão dos sintomas depressivos só ocorre de 3-4 semanas após o início do tratamento (TORRES, GAINETDINOV e CARON, 2003). Uma possível explicação postulada é que a modulação aguda de monoaminas pode levar ativação de autoreceptores monoaminérgicos, diminuindo os disparos neuronais, bem como a liberação de monoaminas. Assim, o tratamento crônico com os antidepressivos é necessário para dessensibilização de tais autoreceptores.



**Figura 12. Hipótese monoaminérgica da depressão.** (a) No cérebro de pessoas saudáveis, os neurotransmissores monoaminérgicos (5-HT, NA e dopamina - amarelo) são liberados e se ligam em receptores encontrados em neurônios pós-sinápticos. Estes neurotransmissores podem ser recaptados por transportadores específicos (rosa) em neurônios pré-sinápticos ou degradados pela enzima monoaminaoxidase. (b) Pacientes depressivos apresentam diminuições nos níveis sinápticos de monoaminas. (c) O bloqueio de transportadores de monoaminas pelo tratamento com antidepressivos aumenta as concentrações e biodisponibilidade de monoaminas na fenda sináptica, reestabelecendo o humor de pacientes depressivos (Adaptado de CASTREN, 2005).

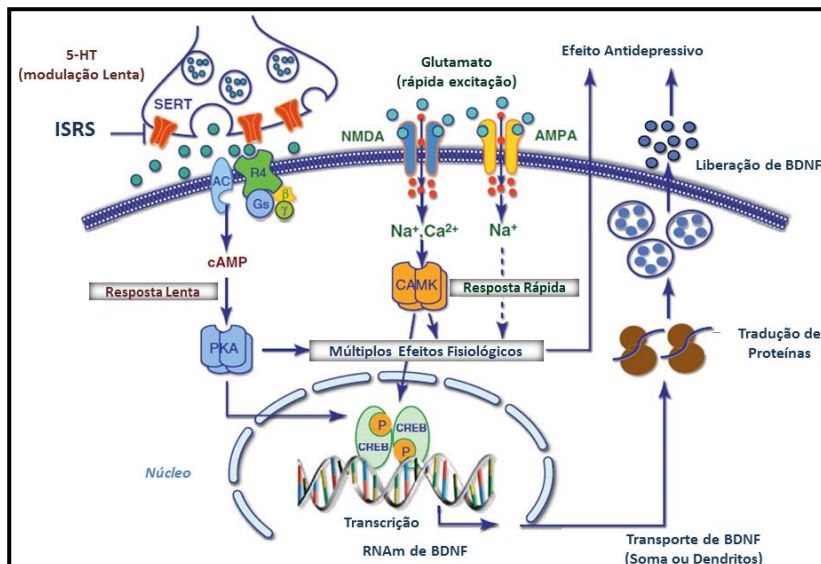
## ii) *Glutamatérgico*

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, mas um excesso deste neurotransmissor na fenda sináptica leva à excitotoxicidade, a qual está associada a condições neuropatológicas como a depressão. Um estudo post-mortem demonstrou níveis elevados de glutamato no córtex frontal de pacientes depressivos (HASHIMOTO, SAWA e IYO, 2007). Evidências demonstram que o receptor NMDA está envolvido na fisiopatologia da depressão, desde que foram verificadas alterações na funcionalidade de tal receptor no córtex frontal de suicidas (NOWAK, ORDWAY e PAUL, 1995). Na última década, estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que compostos que inibem a função dos receptores NMDA exibem propriedade antidepressiva (SKOLNICK, 1999; BERMAN *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2008; SANACORA *et al.*, 2008). Notavelmente, o antagonista de receptores NMDA cetamina produz, em estudos clínicos e em modelos animais, um rápido e sustentado efeito antidepressivo (BERMAN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2010). Assim sendo, os

inibidores dos receptores NMDA estão sendo chamados de antidepressivos do novo milênio (SKOLNICK, 1999).

Entretanto, a resposta antidepressiva rápida da cetamina parece envolver um mecanismo muito mais complexo que o simples antagonismo de receptores glutamatérgicos NMDA. A cetamina aumenta a liberação de glutamato no espaço sináptico de neurônios corticais e este evento parece estar acoplado com a síntese de proteínas sinápticas (MOGHADDAM *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2010). O antagonismo de receptores NMDA pela cetamina parece ocorrer em interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos e assim promove a desinibição de neurônios glutamatérgicos (HOMAYOUN e MOGHADDAM, 2007). A partir da rápida e transiente excitação glutamatérgica, os receptores AMPA são estimulados e promovem uma permeação de íons  $\text{Na}^+$  ao longo da membrana plasmática para dentro da célula neuronal (DUMAN e VOLETI, 2012). Assim, as vias de sinaptogênese são ativadas e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é então liberado no espaço extracelular (JOURDI *et al.*, 2009).

Ao contrário de 5-HT e NA, neurotransmissores que produzem respostas neuronais lentas através da ativação de receptores metabotrópicos, aumento nas concentrações de AMP cíclico, ativação de proteína cinase A, fosforilação de CREB e tradução de proteínas tróficas como BDNF, o glutamato produz rápida excitação de neurônios através da estimulação de receptores ionotrópicos, incluindo os receptores AMPA e NMDA, resultando em uma despolarização transiente e uma rápida sinalização intracelular. Estes eventos levam a um aumento da atividade, por exemplo, da proteína cinase dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-2 (CaMK-2). A diferença entre a ação antidepressiva rápida e lenta é demonstrada na Figura 13.



**Figura 13. Distinção entre os efeitos mediados por fármacos que modulam o sistema serotoninérgico (efeito lento) e os que modulam o sistema glutamatérgico (efeito rápido).** O antidepressivos típicos como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) inibem o transportador de 5-HT, impedindo a recaptação de tal neurotransmissor e aumentando a biodisponibilidade de 5-HT na fenda sináptica, o que leva à ativação de receptores de 5-HT acoplados a proteína G estimulatória. Este evento aumenta a concentração intracelular de AMP cíclico, o qual é capaz de ativar a via de sinalização intracelular mediada pela proteína cinase A (PKA)/ proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) (DUMAN, HENINGER e NESTLER, 1997; KRISHNAN e NESTLER, 2008). Entretanto, esses efeitos requerem um tratamento crônico com os ISRS. Isto deve-se ao fato de que os autoreceptores de 5-HT levam tempo para desensibilizarem e que 5-HT produz respostas neuronais lentas. Por outro lado, o glutamato produz rápida excitação de neurônios através da estimulação de receptores ionotrópicos, incluindo os receptores AMPA e NMDA, resultando em uma despolarização e uma rápida sinalização intracelular, levando a um aumento da atividade por exemplo da proteína cinase dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-2 (CaMK-2) que culmina com a fosforilação de CREB. Um alvo do tratamento com antidepressivos tanto de ação lenta, quanto de ação rápida é o aumento da expressão do BDNF (DUMAN e MONTEGGIA, 2006). A cetamina estimula que transcritos de BDNF sejam transportados para os dendritos, onde serão traduzidos, em subunidades ribossomais, e subsequentemente liberados para o meio extracelular. Estes eventos promovem o efeito comportamental antidepressivo (adaptado de DUMAN e VOLETI, 2012).

Como descrito acima, os receptores AMPA estão envolvidos nas ações antidepressiva de antagonistas do receptores NMDA (MAENG *et al.*, 2008). Na verdade, ambos os receptores NMDA e AMPA, são colocalizados em sinapses no córtex e no hipocampo de ratos (KHARAZIA *et al.*, 1996; HE, JANSSEN e MORRISON, 1998). No entanto, a redução do tempo de imobilidade induzida por CGP 37849, um antagonista do receptores NMDA, não foi antagonizada pelo pré-tratamento com o antagonista de receptores AMPA NBQX no TNF em ratos (DYBALA *et al.*, 2008). Investigações adicionais são necessárias para esclarecer a participação dos receptores AMPA no efeito antidepressivo induzido pela inibição dos receptores NMDA.

LY451646, um potenciador do receptor AMPA, diminuiu o tempo de imobilidade no TNF e no TSC em camundongos (BAI, BERGERON e NELSON, 2003). Outro potenciador do receptor AMPA, LY392098, também apresentou propriedades antidepressiva em camundongos e em ratos (LI *et al.*, 2001). Uma ampaquina CX614 reduziu o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao TNF (SZEWCZYK *et al.*, 2010). Além disso, potenciadores de receptores AMPA aumentam os níveis de BDNF de modo similar aos antidepressivos (ALT, WITKIN e BLEAKMAN, 2005; ALT *et al.*, 2006; O'NEILL e WITKIN, 2007).

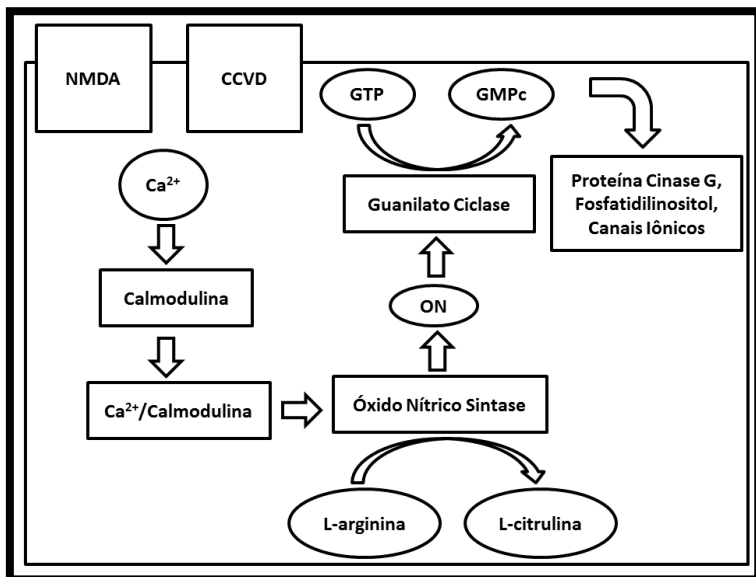
Ainda, estudos pré-clínicos sugerem possíveis efeitos benéficos de antagonistas de receptores metabotrópicos GluR1 e GluR5 e de agonistas de receptores metabotrópicos GluR4, GluR6 e GluR7, ou moduladores alostéricos para alguns tipos de GluRs na fisiopatologia da depressão (TOKITA, YAMAJI e HASHIMOTO, 2012).

A ativação de receptores glutamatérgicos NMDA, cainato ou AMPA, bem como dos canais de voltagem dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasiona um influxo de cálcio e ativa a enzima NOS, que catalisa a conversão de L-arginina em ON (BISHOP e ANDERSON, 2005). Entretanto, o antagonista de receptor NMDA cetamina aumenta as concentrações de ON no estriado e hipocampo de ratos (WU *et al.*, 2000). O ON pode também inibir a função do receptor NMDA através de uma ação direta no receptor (LEI *et al.*, 1992; MANZONI *et al.*, 1992).

Alguns estudos indicam que a via L-arginina/ON é também envolvida na fisiopatologia da depressão (DA SILVA *et al.*, 2000). Concentrações plasmáticas de nitrato encontram-se

significativamente aumentadas em pacientes depressivos (SUZUKI *et al.*, 2001), embora a administração de cortisol (hormônio amplamente associado com a fisiopatologia da depressão) em sujeitos saudáveis promova uma robusta redução nas concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato (KELLY *et al.*, 1998).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado que inibidores da enzima NOS neuronal, como o L-NNA e o 7-nitroindazol, produzem efeito tipo-antidepressivo em modelos animais (HARKIN *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2000; HEIBERG, WEGENER e ROSENBERG, 2002; HARKIN *et al.*, 2003; WEGENER *et al.*, 2003). Outros estudos *in vitro* demonstram que o tratamento com antidepressivos clássicos inibem a atividade da enzima NOS neuronal na região hipocampal (WEGENER *et al.*, 2003; HARVEY *et al.*, 2010). Paradoxalmente, um efeito tipo-antidepressivo foi observado após a administração de L-arginina, um substrato de NOS, em baixas doses, indicando que o ON possa ter um papel dual na modulação do efeito antidepressivo (DA SILVA *et al.*, 2000; INAN, YALCIN e AKSU, 2004; SPIACCI *et al.*, 2008). De forma geral o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA e da via L-arginina/ON na fisiopatologia da depressão é ilustrada na Figura 14.



**Figura 14. Clássica hipótese do envolvimento dos subtipos de receptores glutamatérgicos NMDA e da via L-arginina/ON na etiologia da depressão.** Uma excitotoxicidade glutamatérgica promove aumento da ativação de NMDA e do canal de cálcio voltagem dependente (CCVD) e isto promove um grande influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que ativa a proteína cinase dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina que por sua vez ativa a enzima NOS que promove a conversão de L-arginina a L-citrulina e ON e este pode ter ações transsinápticas ou mesmo aumentar a atividade da enzima guanilato ciclase que converte GTP em GMPc, o qual ativa a proteína cinase ativada por GMPc, que ativa eventos correlacionados com processos de morte celular. NMDA: N-Metil-D-Aspartato; CCVD: Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente (adaptado de PAUL e SKOLNICK, 2003).

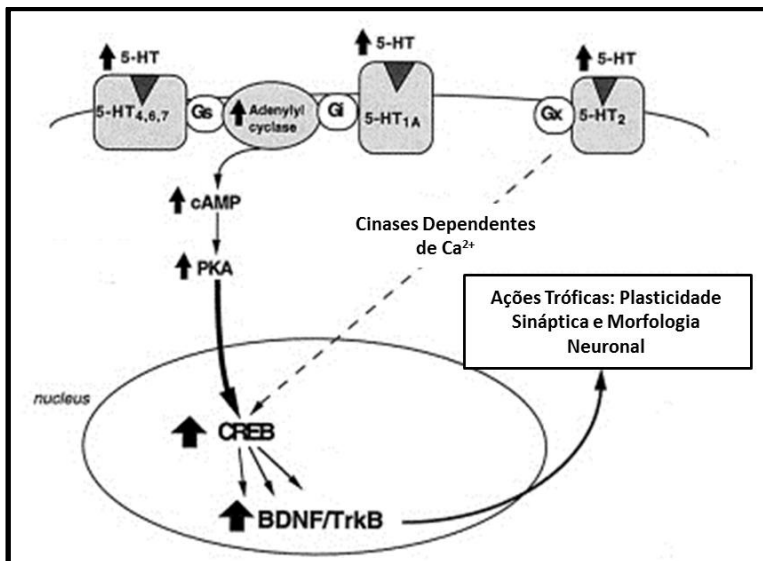
### 1.1.5. Cinases intracelulares envolvidas na fisiopatologia da depressão

Alguns estudos têm mostrado que o tratamento crônico com antidepressivos regula vários fatores envolvidos nas vias de sobrevivência celular, dentre eles, a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), BDNF, proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a proteína cinase da cinase ativada por mitógenos (MAPKK) (MANJI *et al.*, 1999; MANJI e CHEN, 2000; MANJI *et al.*, 2000; D'SA e DUMAN, 2002; BLENDY, 2006). Vários trabalhos mostraram também que os antidepressivos ativam as vias de sinalização



intracelular mediada pela proteína cinase dependentes de AMPc (PKA), proteínas cinase C (PKC), proteína cinase B (PKB) ou AKT, proteína cinase dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina II (CaMK-2), proteína cinase ativada por mitógenos (MAPKK) e ERK (POPOLI *et al.*, 2000; D'SA e DUMAN, 2002; MALBERG e BLENDY, 2005). Essas proteínas cinases fosforilam CREB, o qual aumenta a expressão de genes correlacionados com a sobrevivência e proliferação celular, como o gene de BDNF (DUMAN, MALBERG e THOME, 1999; NAIR e VAIDYA, 2006; CASTREN, VOIKAR e RANTAMAKI, 2007).

A proteína cinase A é uma holoenzima tetramérica com duas subunidades regulatórias e duas subunidades catalíticas. A ativação de receptores metabotrópicos ligados a uma proteína G estimulatória, por exemplo, por 5-HT ou NA promovem aumentos nas concentrações de AMPc e isto promove ativação das subunidades catalíticas da PKA (Figura 15). Esta enzima está funcionalmente envolvida na síntese de neurotransmissores, expressão de genes correlacionados com plasticidade neuronal, regulação da atividade de canais iônicos, diferenciação, sobrevivência e proliferação celular (DUMAN, 2002; GOULD e MANJI, 2002). Alguns estudos demonstram uma significativa diminuição da atividade de PKA em fibroblastos de indivíduos com depressão (MANIER *et al.*, 1996; SHELTON, MAINER e SULSER, 1996; SHELTON *et al.*, 1999).



**Figura 15. Ativação de PKA por antidepressivos.** Muitos antidepressivos aumentam as concentrações de 5-HT, e esta amina biogênica ativa alguns subtipos de receptores serotoninérgicos acoplados a proteína G, que por sua vez ativa a enzima adenilato ciclase, a qual aumenta as concentrações de AMP cíclico. O AMP cíclico se liga a subunidade regulatória da PKA que então se dissocia da subunidade catalítica da mesma enzima e esta pode então fosforilar diversos alvos intracelular como a MAP cinase ou o ativador transcricional CREB, e assim os ativam. A partir disto diversos genes dependentes de AMP cíclico são induzidos (como o gene correlacionado com BDNF) e assim acredita-se que ocorra a resposta antidepressiva (Adaptado de DUMAN, 1998).

A via de sinalização intracelular mediada pelas proteínas MEK/ERK regula vários processos celulares como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (SCHAEFFER e WEBER, 1999). MERCIER *et al.* (2004) demonstraram que fluoxetina rapidamente induz genes correlacionados a sobrevivência e proliferação celular (como o gene correlacionado com o BDNF e o fator neurotrófico derivado de células gliais, GDNF) mediado por MEK em culturas de astrócitos. Entretanto a administração crônica com fluoxetina causou uma inibição da atividade de ERK 1 e 2 em estruturas encefálicas de ratos (FUMAGALLI *et al.*, 2005). Assim,

como essa via de sinalização intracelular é modulada por antidepressivos ainda não é totalmente elucidado.

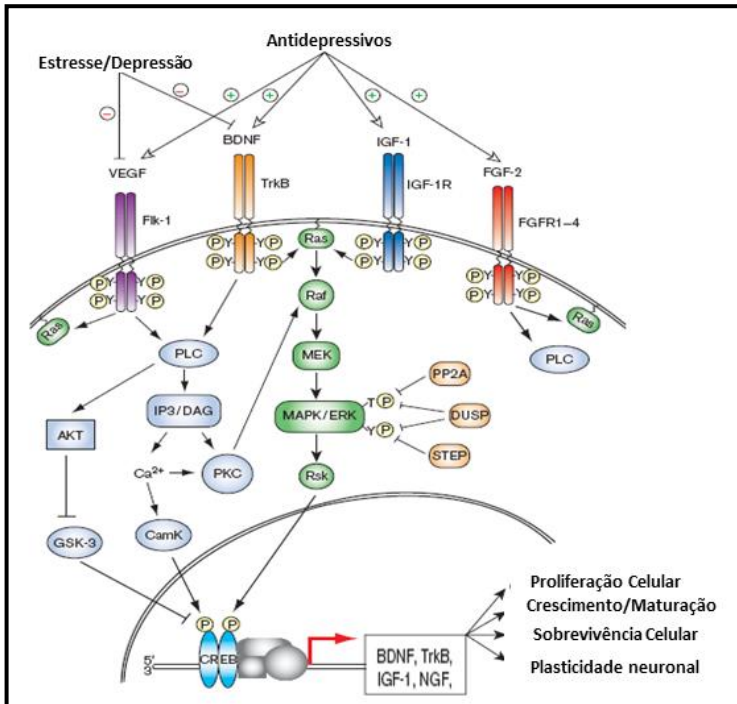
A CaMK-2 é a proteína cinase mais abundante no cérebro (POPOLI *et al.*, 2000) e modula vários aspectos da função neuronal, como síntese de neurotransmissores, excitotoxicidade, expressão gênica, além de interagir com o citoesqueleto, regulando assim processos de transporte celular (DU *et al.*, 2004). Vários estudos demonstram que o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a fosforilação e atividade de CaMK-2 no hipocampo de ratos (DUMAN, MALBERG e THOME, 1999; MANJI, DREVETS e CHARNEY, 2001; POPOLI, GENNARELLI e RACAGNI, 2002), sugerindo-se que esta proteína apresenta uma importante função na modulação do humor.

Outra proteína cinase com importante papel na transdução de sinais intracelulares é a PKC que faz parte das proteínas cinase serina-treonina ativadas por lipídeos e cálcio (PARKER e MURRAY-RUST, 2004; POOLE *et al.*, 2004). Estas proteínas regulam diferentes funções celulares como crescimento, diferenciação e proliferação celular, excitotoxicidade e condutância iônica (KANASHIRO e KHALIL, 1998). Alguns estudos sugerem que a PKC esteja associada à fisiopatologia de comportamentos suicidas, uma vez que a atividade catalítica e a expressão desta proteína estejam diminuídas em encéfalos de pacientes depressivos suicidas (PANDEY *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2008).

A PI3K é uma família de cinases que catalizam a fosforilação de lipídeos de fosfatidilinositol na posição 3' do inositol em resposta a estimulação celular por fatores de crescimento, hormônios e citocinas (KATSO *et al.*, 2001; CANTLEY, 2002). Alguns estudos tem implicado PI3K em processos de plasticidade sináptica, aprendizado e memória e depressão maior (KELLY e LYNCH, 2000; BUDNI *et al.*, 2012). Produtos lipídicos de PI3K atuam como segundos mensageiros por recrutar proteínas tais como AKT, ativando estas cinases (BRAZIL, YANG e HEMMINGS, 2004).

AKT, também chamada de proteína cinase B, é uma serina/treonina cinase que tem um domínio de homologia de plextrina em sua região N-terminal. A ativação de AKT envolve seu recrutamento a membrana plasmática por fosfatidilinositol fosforilado (PtdIns-3,4,5-P), a fosforilação no resíduo treonina regulatório (treonina 308) pela cinase dependente de fosfatidilinositol 1 (PDK1) e a fosforilação de outro resíduo regulatório (serina 473) pelo complexo PDK2/mTOR-Rictor

(FRANKE *et al.*, 1995; ANDJELKOVIC *et al.*, 1997; FRANKE *et al.*, 1997; ALESSI e DOWNES, 1998; SCHEID, MARIGNANI e WOODGETT, 2002; JACINTO *et al.*, 2006; BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). Ao longo dos anos, AKT está sendo implicada em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a regulação da gliconeogênese, proliferação celular, morte celular programada, embriogênese e controle do ritmo circadiano (COHEN e FRAME, 2001; FRAME e COHEN, 2001; FRAME, COHEN e BIONDI, 2001; WOODGETT, 2003; COHEN e GOEDERT, 2004; BORRELLI *et al.*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado um importante papel da AKT na ação de estabilizantes de humor e em processos de aprendizado e memória (SUI, WANG e LI, 2008; ABELAIRA *et al.*, 2011). Estas vias de sinalização estão esquematicamente representadas na Figura 16.

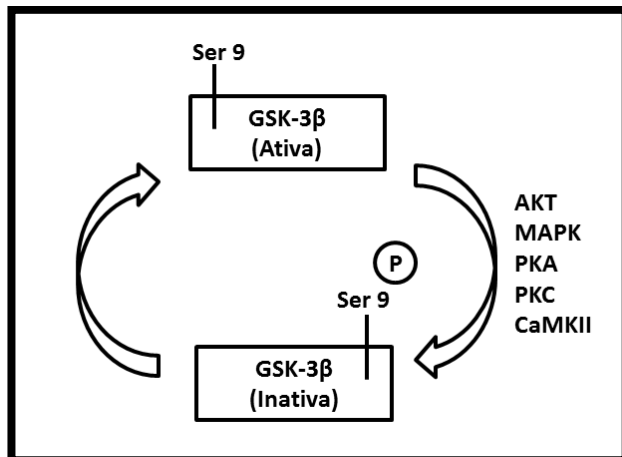


**Figura 16. Convergência de cascatas de sinalização intracelular mediadas por diferentes respostas celulares ao estresse/depressão e antidepressivos.** Distintas mudanças na expressão de fatores neurotróficos/crescimento são observadas após a exposição ao estresse ou antidepressivos. Ativação de fatores neurotróficos leva à ativação de vias de sinalização intracelular mediadas por fosfolipase C e MAPK que convergem na transcrição gênica mediada por CREB. Ativação de CREB aumenta a expressão de neurotrofinas, fatores de crescimento e seus correlatos que regulam a plasticidade neural, neurogênese e morfologia dendrítica. BDNF: Fator neurotrófico derivado do encéfalo; CREB, proteína de ligação responsiva ao AMPc; ERK: cinase dependente de estímulos extracelulares; FGF-2: Fator de crescimento do fibroblasto 2; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina 1; MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos; NGF: Fator de crescimento do nervo; PLC, fosfolipase C; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (adaptado de SCHMIDT e DUMAN, 2007).

A AKT inibe a enzima glicogênio sintase cinase-3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ) e a enzima glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) em resposta à ação de diversos hormônios e fatores de crescimento, incluindo o fator

neurotrófico derivado do encéfalo e o fator de crescimento semelhante à insulina (CROSS *et al.*, 1995; FRAME e COHEN, 2001; CHEN e RUSSO-NEUSTADT, 2005). Essas cinases são constitutivamente ativas e podem ser inativadas através de fosforilação nos resíduos serina-21 (GSK3 $\alpha$ ) e serina-9 (GSK3 $\beta$ ) em seus respectivos domínios amino-terminal regulatórios (Frame e Cohen, 2001). A inibição de GSK3 $\beta$  está envolvida na ação antidepressiva de alguns compostos farmacológicos, como o ARA014418 e o ácido fólico (GOULD *et al.*, 2004; BUDNI *et al.*, 2012).

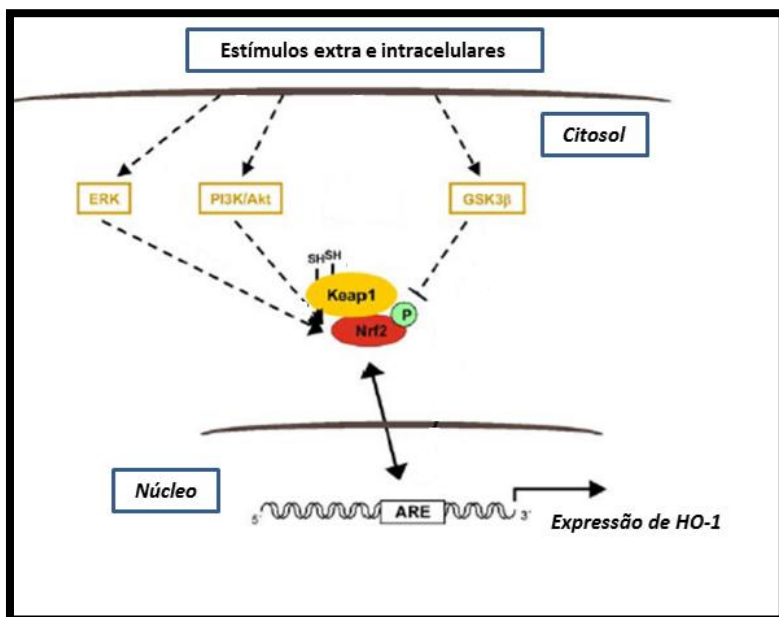
A inativação de GSK3 $\beta$  pode ser induzida por fosforilação em um resíduo N-terminal: Serina 21 para GSK-3 $\alpha$  e Serina 9 para GSK-3 $\beta$  (PLYTE *et al.*, 1992) que pode ser alvo farmacológico para agentes antidepressivos e neuroprotetores. A fosforilação de GSK-3 $\beta$  e, por conseguinte sua inativação, pode ser mediada por diversas cinases intracelulares, incluindo a proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), AKT, algumas isoformas de PKC, PKA e CaMK-2 (Figura 17) (ROMMEL *et al.*, 2001; JOPE e ROH, 2006; SONG *et al.*, 2010).



**Figura 17. Cinases envolvidas na fosforilação e inativação de GSK-3 $\beta$ .** Distintas cinases participam do processo de fosforilação de GSK-3 $\beta$  em seu resíduo de serina 9, como a proteína cinase A, a proteína cinase B (ou AKT), a proteína cinase C. Em sua forma fosforilada GSK-3 $\beta$  e seu papel pró-apoptótico é então inativado.

Ainda, estudos recentes estão descrevendo um papel de GSK3 $\beta$  na exclusão nuclear e inativação do fator relacionado ao fator nuclear do eritróide-2 (Nrf2) (SALAZAR *et al.*, 2006; ROJO *et al.*, 2008; ROJO, SAGARRA e CUADRADO, 2008). GSK3 $\beta$  fosforila Nrf2 e esse evento promove a translocação deste fator de transcrição do núcleo para o citosol, “silenciando” a atividade transcricional do mesmo. Além disso, a inibição de GSK-3 $\beta$  leva a um aumento da atividade transcricional de Nrf2 (ROJO *et al.*, 2008; ROJO, SAGARRA e CUADRADO, 2008). Nrf2 está normalmente associado à proteína Keap 1, e desta maneira é degradado por ubiquitinação. Entretanto, quando Nrf2 é fosforilado ele se dissocia de Keap 1 e transloca para o núcleo. Nrf2 é um fator de transcrição que se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) localizado na região promotora de genes que codificam algumas enzimas antioxidantes, como a hemeoxigenase-1(HO-1) e proteínas responsivas ao estresse (KATSUOKA *et al.*, 2005; KENSLER, WAKABAYASHI e BISWAL, 2007). Um estudo recente do nosso grupo tem demonstrado que camundongos *knockout* para Nrf2 apresentam comportamento tipo-depressivo, visto que aumentam o tempo de imobilidade no TNF e diminuem a autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou ainda que fluoxetina e desipramina promovem a translocação de Nrf2 do citosol para o núcleo e assim promovem a indução de HO-1 (LIN *et al.*, 2012). Além disso, um estudo sugere que ativadores de Nrf2 teriam um grande potencial antidepressivo (MAES *et al.*, 2012).

Algumas evidências experimentais têm indicado que a via de sinalização celular mediada por PI3K/AKT não somente induz a expressão gênica de HO-1, como também seus efeitos neuroprotetores são dependentes da transcrição e atividade da HO-1 (MARTIN *et al.*, 2004). Outras vias de sinalização também estão correlacionadas com a fosforilação de Nrf2 e indução de HO-1, como a via de sinalização intracelular mediada por ERK 1/2 (WRUCK *et al.*, 2007; CONG *et al.*, 2013). A convergência de vias de sinalização intracelular em relação à translocação de Nrf2 do citosol para o núcleo e a indução de HO-1 é demonstrada na Figura 18.



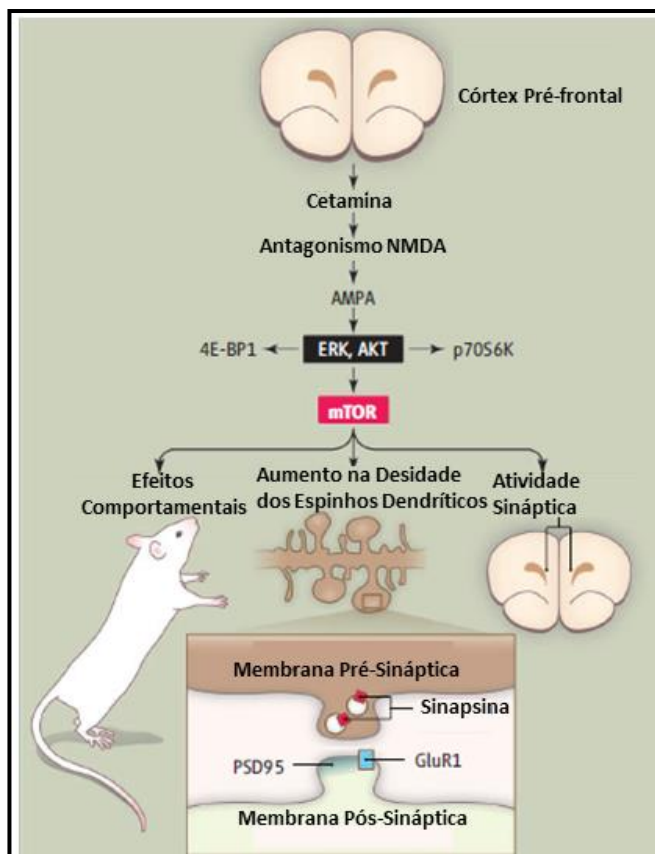
**Figura 18. Cascatas de sinalização intracelular mediadas por Keap1/Nrf2 que regulam a expressão gênica de Hemeoxigenase-1.** Representação esquemática de cascatas de sinalização que estão envolvidas na regulação da expressão gênica de Hemeoxigenase-1 através de uma interação com Nrf2. Fosforilação mediada por GSK3 $\beta$  está sendo demonstrada regular a atividade de Nrf2. ARE: Elemento de resposta antioxidante; ERK: cinase regulada por estímulos extracelulares; GSK3 $\beta$ : glicogênio sintase cinase 3 $\beta$ ; Keap1: proteína associada à ECH semelhante à Kelch 1; Nrf2: fator relacionado ao fator nuclear do eritróide2-2; PI3K: fosfatidilinositol 3 cinase.

Além disso, AKT e MEK/ERK levam a ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma proteína cinase que apresenta como alvos as proteínas p70S6K e PHAS-1/4E-BP1, e estas por sua vez estão sendo implicadas em processos de síntese de proteínas (LIN *et al.*, 1994; LIN e LAWRENCE, 1994; TERADA *et al.*, 1994; LIN e LAWRENCE, 1996; BRUNN *et al.*, 1997a; BRUNN *et al.*, 1997b; RHOADS, 1999). O aumento da tradução de proteínas é correlacionado com atividade antidepressiva, sinaptogênese, e aumento na densidade de espinhos dendríticos. Atualmente, está sendo demonstrado que antidepressivos com ação



rápida como a cetamina ativam as vias de sinalização celular mediadas por mTOR (CRYAN e O'LEARY, 2010; LI *et al.*, 2010).

A cetamina é um clássico antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA e promove uma transiente liberação de glutamato com ativação de receptores AMPA (DUMAN e VOLETI, 2012). A cetamina administrada agudamente aumenta os níveis de BDNF que por sua vez ativa os receptores trkB e desencadeia uma ativação de MEK/ERK e AKT que convergem para a ativação de mTOR e este evento está correlacionado com tradução de proteínas sinápticas como PSD95 que medeiam processos de sinaptogênese e promovem um aumento na arborização dendrítica, culminando em uma resposta antidepressiva rápida (CRYAN e O'LEARY, 2010; LI *et al.*, 2010; DUMAN e VOLETI, 2012). Estes eventos estão representados na Figura 19.



**Figura 19. Ação antidepressiva rápida da cetamina mediada por ativação de mTOR.** Em ratos uma única dose de cetamina é suficiente para ativar a via da mTOR no córtex pré-frontal, aumentando a expressão de proteínas sinápticas e a densidade de espinhos dendríticos, produzindo uma resposta tipo-antidepressiva. AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazole-propionato; 4E-BP1, Fator eucariótico de iniciação 4E ligado à proteína 1; ERK, cinase regulada por sinais extracelulares; GluR1, subunidade 1 do receptor AMPA; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos, NMDA, N-metil-D-aspartato; p70S6K, p70S6 cinase (adaptado de CRYAN e O'LEARY, 2010).

### 1.1.6. Hipótese inflamatória da depressão

Nos últimos 20 anos, numerosos estudos e meta-análises indicam uma associação clara entre a ativação do sistema imune, níveis de citocinas pró-inflamatórias e doenças psiquiátricas (MIKOVA *et al.*, 2001; TUGLU *et al.*, 2003; DOWLATI *et al.*, 2010). A relação entre depressão e inflamação foi estabelecida devido aos vários estudos demonstrando que pacientes depressivos têm aumentado marcadores inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (HOWREN, LAMKIN e SULS, 2009; DOWLATI *et al.*, 2010).

Além disso, a presença de algumas doenças inflamatórias, tais como a doença inflamatória do intestino, esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide, e doenças neuro-inflamatórias, estão correlacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento da depressão (GRAFF *et al.*, 2009). Corroborando com a hipótese inflamatória da depressão, foi demonstrado também que pacientes com câncer ou hepatite C crônica, tratados com citocinas inflamatórias, têm um risco maior no desenvolvimento da depressão (CAPURON, RAVAUD e DANTZER, 2000; BONACCORSO *et al.*, 2001). Além disso, tem sido demonstrado que a administração de citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e TNF- $\alpha$  induz um comportamento depressivo em ratinhos (KASTER *et al.*, 2012; PING *et al.*, 2012).

Nrf2 é um fator de transcrição que desempenha um papel central na defesa celular contra insultos oxidativos e é relatado desempenhar um papel crucial na regulação da inflamação. Camundongos *knockout* para Nrf2 exibem um comportamento tipo-depressivo (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013; MURAMATSU *et al.*, 2013). Além disso, o sulforafano, um clássico indutor de HO-1 reverte o aumento de imobilidade no TSC induzido pela administração de lipopolissacarídeo (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013).

### 1.1.7. Disfunções metabólicas envolvidas na depressão

Vários trabalhos sugerem uma alteração no metabolismo cerebral na fisiopatologia da depressão (MAYBERG *et al.*, 1994; MORETTI, GORINI e VILLA, 2003). Estudos têm demonstrado

uma diminuição no metabolismo energético dos lobos frontais e dos gânglios basais em pacientes depressivos (KENNEDY *et al.*, 2001; DREVETS *et al.*, 2002). Além disso, pacientes com depressão mostraram uma diminuição significativa na produção de ATP no músculo e no cérebro (MOORE, 1997; VOLZ *et al.*, 1998; GARDNER *et al.*, 2003a; GARDNER *et al.*, 2003b).

O metabolismo da glicose no córtex pré-frontal foi negativamente correlacionado com a severidade da depressão e com a resposta ao tratamento antidepressivo (BAXTER *et al.*, 1989; SAXENA *et al.*, 2003). Além disso, um estudo demonstrou uma disfunção metabólica em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível moderado (um modelo de depressão em roedores) que vai desde uma disfunção na glicólise até deficiência na fosforilação oxidativa por meio de alterações significativas na expressão de sete proteínas diferenciais: três proteínas glicolíticas (hexocinase ↓, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ↑, α-enolase ↑↓), duas proteínas do ciclo do ácido tricarboxílico (a subunidade dihidrolipoiltransacetilase da piruvato desidrogenase ↓, 2-oxoglutarato desidrogenase ↓), e duas proteínas da cadeia transportadora de elétrons (a subunidade NADH desidrogenase [ubiquinona] ferro-enzofre-3 do complexo I mitocondrial ↑, a subunidade citocromo C1 do complexo III mitocondrial ↑↓) (YANG *et al.*, 2013). Como a hexocinase é o passo inicial, não reversível da glicólise, uma *downregulation* da hexocinase no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível moderado é consistente com estudos de tomografia por emissão de pósitrons mostrando uma diminuição no metabolismo da glicose no córtex pré-frontal de pacientes depressivos (SUBRAMANIAN e MILLER, 2000). Além disso, (MADRIGAL *et al.*, 2001) também relataram que o estresse crônico (imobilização por seis horas durante 21 dias) inibiu os complexos I-III e II-III da cadeia transportadora de elétrons no encéfalo de ratos. Também foi relatada uma inibição da atividade dos complexos mitocondriais I, III e IV após o estresse crônico imprevisível por 40 dias (REZIN *et al.*, 2008). Rezin *et al.* (2008) também relataram que os complexos mitocondriais I, III e IV foram inibidos no córtex cerebral e cerebelo de ratos após o estresse crônico durante 21 dias. Todas essas evidências sustentam a hipótese metabólica da fisiopatologia da depressão.

Antidepressivos clássicos como a imipramina, amitriptilina e mianserina aumentam o nível de ATP em cultura primária de astrócitos (TRZECIAK *et al.*, 1995). Lítio aumenta a atividade dos

complexos mitocondriais I-III e II-III da cadeia transportadora de elétrons (MAURER, SCHIPPEL e VOLZ, 2009). Além disso, no hipocampo, no cerebelo e no estriado de ratos administrados cronicamente com bupropiona a atividade do complexo II mitocondrial foi aumentada (FERREIRA *et al.*, 2012). O ISRS citalopram aumenta a atividade da citrato sintase, uma proteína do ciclo do ácido tricarboxílico (HROUDOVA e FISAR, 2010). O choque eletroconvulsivo (um modelo animal para eletroconvulsoterapia) induziu a um aumento nas atividades dos complexos mitocondriais II e IV da cadeia transportadora de elétrons (BURIGO *et al.*, 2006). Pode-se concluir que os antidepressivos farmacológicos ou não farmacológicos têm um efeito significativo sobre o metabolismo energético.



## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando que: a) a depressão apresenta uma alta prevalência na população mundial (BERTON e NESTLER, 2006), com impacto na função social e na qualidade de vida de pacientes (NESTLER e CARLEZON, 2006; NEMEROFF, 2007); b) o tratamento com antidepressivos convencionais (tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase (MAO), ISRS e ISRN não promove alteração no humor para cerca de 50% dos indivíduos (NESTLER *et al.*, 2002; RUSH, THASE e DUBE, 2003); c) a terapia antidepressiva produz inúmeros efeitos colaterais (BRUNELLO *et al.*, 2002), reduzindo, assim, a adesão de pacientes ao tratamento (MACGILLIVRAY *et al.*, 2003; SLEATH, WURST e LOWERY, 2003); d) a depressão exibe uma grande comorbidade com outras doenças como a DP (STARKSTEIN *et al.*, 1989; HALTENHOF e SCHROTER, 1994; ZAHODNE *et al.*, 2012), existe uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento convencional da depressão.





### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito antidepressivo da creatina, bem como os alvos moleculares envolvidos em tal efeito.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Verificar o efeito da administração aguda de creatina por via oral (p.o.) no TSC.
- ii. Investigar o envolvimento dos receptores dopaminérgicos  $D_1$  e  $D_2$  no efeito antidepressivo da creatina no TSC.
- iii. Verificar o envolvimento do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico no efeito antidepressivo da creatina no TSC.
- iv. Investigar o envolvimento do receptor  $5-HT_{1A}$  no efeito antidepressivo da creatina no TSC.
- v. Investigar o efeito da interação entre creatina e os antidepressivos inibidores do transportador de noradrenalina, serotonina ou dopamina no TSC.
- vi. Verificar o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA no efeito antidepressivo da creatina no TSC.
- vii. Investigar a participação da via L-arginina/ON no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC
- viii. Verificar o envolvimento da ativação de diversas cinases intracelulares como PI3K, PKA, PKC, CaMK-2, MEK 1/2 E GSK-3 $\beta$  no efeito antidepressivo da creatina no TSC
- ix. Verificar a modulação da enzima HO-1 no efeito antidepressivo da creatina no TSC



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Para os experimentos foram utilizados camundongos machos e fêmeas Swiss, pesando entre 30-45 g, com 45-70 dias de vida. Os animais foram mantidos a temperatura de 22-25°C com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (ciclo claro iniciando às 7:00 h). Todos os experimentos foram realizados entre 11:00 e 17:00 h, com cada animal usado somente uma vez (N = 7-11 animais por grupo). Animais foram ambientados no local da experimentação 24 horas antes da observação comportamental. Os camundongos foram distribuídos de forma aleatória nos grupos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA-UFSC) sob protocolos PP00466, PP00570, PP00657, PP00795.

### 4.2. DROGAS

As seguintes drogas foram usadas nos experimentos: creatina monohidratada, hidrocloreto de bupropiona, hidrocloreto de sertralina, hidrocloreto de paroxetina, hidrobrometo de citalopram, hidrocloreto de fluoxetina, hidrocloreto de imipramina, hidrocloreto de amitriptilina, mesilato de reboxetina, hidrocloreto de prazosina, hidrocloreto de ioimbina,  $\alpha$ -metil-p-tirosina (AMPT), hidrocloreto de fenilefrina, hidrocloreto de clonidina, p-clorofenilalanina metil éster (PCPA), hidrobrometo de ( $\pm$ )-8-Hidroxi-2-(dipropilamino)tetralina (8-OHDPAT), WAY100635, hidrocloreto de SKF38393, hidrocloreto de SCH23390, ( $\pm$ )-sulpirida, hidrocloreto hemidratado de R-(-) apomorfina, haloperidol, ácido N-metil-D-aspartato (NMDA), D-serina, arcaina, hidrocloreto de cetamina, maleato de dizocilpina (MK-801), L-arginina, S-Nitroso-N-acetil-DL-penicillamina (SNAP), 7-nitroindazol, hidrocloreto de 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (LY294002), wortmanina, rapamicina, hidrocloreto de N-[2-[[3-(4-Bromofenil)-2-propenil]amino]etil]-5-isoquinolinosulfonamida (H-89), KN-62, 2-(2-amino-3-methoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona (PD98059), U0126, cloreto de queleritrina, protoporfirina de cobalto (PPCo), protoporfirina de zinco (PPZn), AR014418, cloreto de lítio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.). Todas as drogas foram diluídas

em salina, exceto 7-nitroindazol que foi diluído em salina com 1% de Tween 80, inibidores de cinases que foram diluídos em salina com 0,1% de DMSO e creatina, bupropiona, sertralina, paroxetina, citalopram, fluoxetina, imipramina, amitriptilina, reboxetina, cloreto de lítio e MK-801 que foram diluídas em água destilada.

Creatina, bupropiona, sertralina, paroxetina, fluoxetina, citalopram, imipramina, amitriptilina, reboxetina, cloreto de lítio e MK-801 foram administrados por via oral (p.o.) por gavagem em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal. Arcaína, sulpirida, apomorfina, prazosina, ioimbina, 8-OHDPAT, haloperidol, 7-nitroindazol e cetamina foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal. SKF38393, SCH23390 e WAY100635 foram administrados por via subcutânea (s.c.) em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal. NMDA, D-serina, SNAP, LY294002, wortmanina, H-89, KN-62, PD98059, U0126, queleritrina, protoporfirina de cobalto, protoporfirina de zinco e AR01441 foram administrados através de injeções intracerebroventricular (i.c.v.) em um volume constante de 5 µl/sítio e rapamicina administrada i.c.v. em um volume constante de (2 µl/sítio). Animais controles receberam os veículos apropriados. Comida e água foram retiradas uma hora antes do início das administrações das drogas. As drogas ou veículo foram administrados de acordo com os protocolos experimentais mostrados nas Figuras 20, 21 e 22.

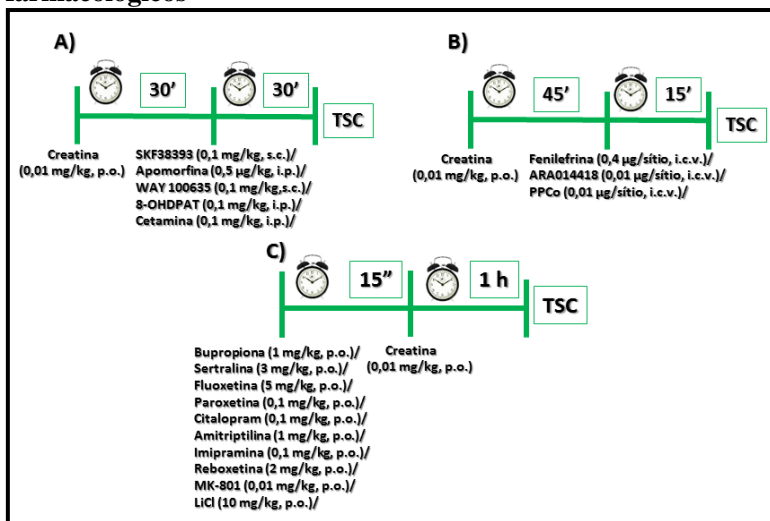
#### 4.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

##### 4.3.1. Investigação do efeito antidepressivo da administração aguda de creatina em doses crescentes por via oral



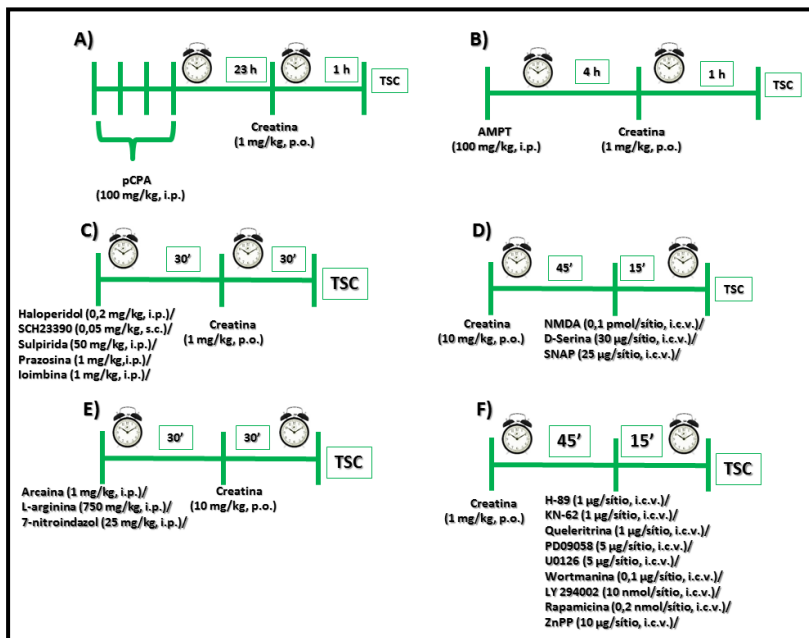
**Figura 20. Protocolo experimental da administração de doses crescentes de creatina em camundongos submetidos ao TSC.** Creatina foi administrada em doses crescentes (0,01-1000 mg/kg, p.o.) em camundongos machos e fêmeas. O tratamento foi realizado 60 minutos antes do TSC. O grupo veículo recebeu o tratamento com água destilada.

#### 4.3.2. Protocolos que buscam verificar o efeito antidepressivo sinérgico de creatina, em dose sub-efetiva (uma dose que não apresenta efeito *per se*) em combinação com compostos farmacológicos



**Figura 21. Protocolo experimental da interação de creatina e agentes farmacológicos no TSC.** Para realizar a investigação do efeito da combinação de doses sub-efetivas de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) e de diversos agentes farmacológicos foram realizados protocolos distintos de administração esquematicamente apresentados. Os grupos controles receberam os veículos apropriados para cada tipo de administração.

### 4.3.3. Protocolos que buscam verificar se o efeito antidepressivo da creatina pode ser revertido por agentes farmacológicos de distintas classes



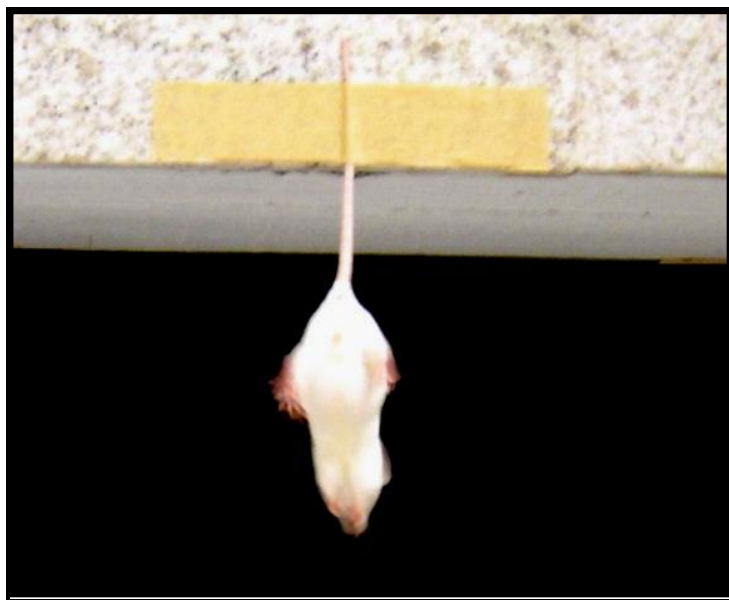
**Figura 22.** Esquema do efeito de moduladores farmacológicos de sistemas de neurotransmissão e de vias de sinalização intracelular no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC. A fim de investigar a influência de agentes farmacológicos de distintas classes no efeito antidepressivo da creatina foram realizados protocolos distintos de administração esquematicamente apresentados. Os grupos controles receberam os veículos apropriados para cada tipo de administração.

## 4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.4.1. Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O teste da suspensão pela cauda é um modelo amplamente utilizado para analisar a atividade tipo-antidepressiva de compostos farmacológicos em camundongos. O teste é baseado no fato que animais que são submetidos a curtos períodos de estresse inescapável pela suspensão de sua cauda tendem a desenvolver uma postura imóvel. O tempo total de duração da imobilidade foi medido

de acordo com o método de (STERU *et al.*, 1985). Os camundongos acústica e visualmente isolados foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 6 minutos (Figura 23). Os camundongos são considerados imóveis somente quando eles estão completamente parados. Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (STERU *et al.*, 1985; RODRIGUES *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2003; CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005; MACHADO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2012). Os animais foram analisados por um observador “cego” acerca das drogas utilizadas no tratamento.



**Figura 23. Teste da Suspensão pela Cauda (TSC)**

#### **4.4.2. Teste do campo aberto (TCA)**

Desde seu desenvolvimento por Calvin Hall (HALL, 1934, 1936), o TCA é utilizado como uma ferramenta importante nas pesquisas comportamentais. A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao TCA, conforme descrito anteriormente (RODRIGUES *et al.*, 1996).



O TCA foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com todas as patas foi registrado em uma sessão de 6 minutos (Figura 24). As respostas comportamentais foram registradas por um observador “cego” para o tratamento. O chão do aparato utilizado no TCA foi limpo com etanol 10% entre as sessões.



**Figura 24. Teste do campo aberto (TCA).** A: visão frontal do aparato, B: visão superior do aparato,

## 4.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.5.1. Análise de NO<sub>x</sub>

O ON é instável e rapidamente oxidado a nitrato e nitrito após sua produção. Em seguida, os metabólitos foram determinados utilizando a análise de NO<sub>x</sub>, um método modificado descrito por (HEVEL e MARLETTA, 1994). Resumidamente, os homogenatos de hipocampo (“pool” de três hipocampus) ou de córtex cerebral foram misturados com 25% de ácido tricloroacético e centrifugados a 1800 g durante 10 min. O sobrenadante foi imediatamente neutralizado com bicarbonato de potássio 2 M. Nitrito foi medido após conversão enzimática pela nitrato redutase e nitrito foi medida utilizando a reação colorimétrica de Griess em um leitor de microplacas no comprimento de onda 540 nm (ZOMKOWSKI *et al.*, 2012; LUDKA *et al.*, 2013). Os valores obtidos por este procedimento representam a soma de nitrito e nitrato derivado do ON. Uma curva padrão foi feita com nitrato de sódio (0-80 mM). Os resultados foram expressos como 100% de níveis de NO<sub>x</sub> do grupo de controle.

#### 4.5.2. Western Blot

Os animais foram decapitados e os hipocampus foram dissecados, pesados e homogeneizados mecanicamente (1:10, v:v) em tampão (SDS 4%, EDTA 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 8%, e Tris 50 mM, pH 6,8). As proteínas (60  $\mu$ g de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (miniVE Vertical Electrophoresis System®, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) utilizando gel 10% (CORDOVA *et al.*, 2004). As proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h). As membranas foram bloqueadas 1 h com leite desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforilada e total de AKT, foram detectadas com o uso de anticorpos primários específicos diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2,5%, pH 7,5) nas diluições, 1:1000 (antifosfo-AKT-Ser-473, anti-AKT e anti- $\beta$ -actina) e anticorpos secundários específicos conjugados com peroxidase (1:10000).

As reações foram desenvolvidas por quimiluminescência e reveladas com o uso de filme radiográfico específico (Amersham Hyperfilm®, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). Todas as etapas de bloqueio e de incubação foram seguidas por três lavagens (5 min. cada) das membranas com TBS-T. A densidade óptica das bandas foi quantificada com o programa Scion Image® (Frederick, MD, EUA) e os níveis de fosforilação foram obtidos pela relação das densidades ópticas das formas fosforilada/total (POSSER *et al.*, 2007).

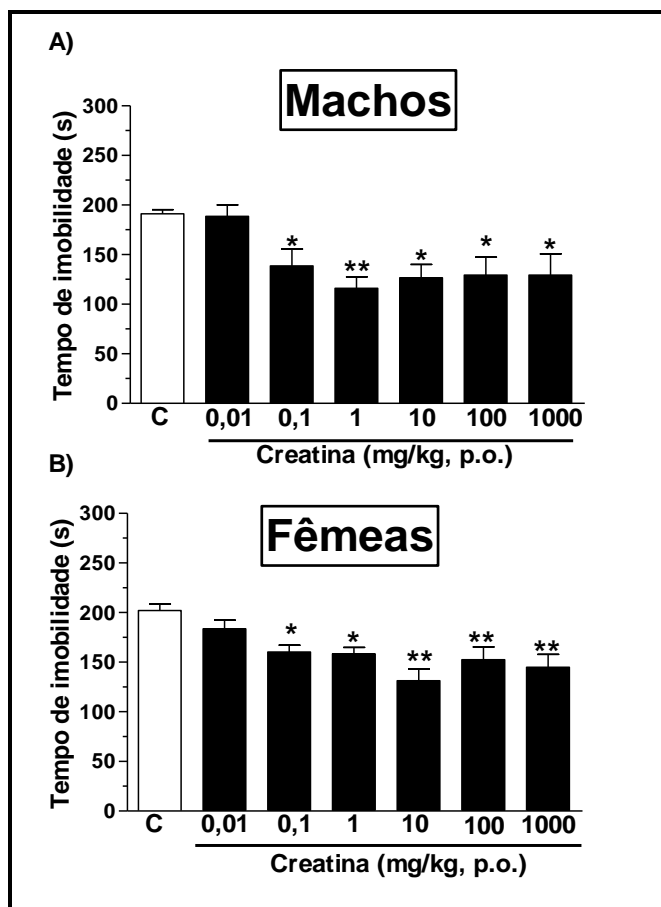
#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média + S.E.M. Para a análise estatística, utilizamos o programa Statistica 7.0 e para confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. Comparações entre grupos experimentais e grupos controle foram realizadas através de ANOVA de uma ou duas vias seguida de post-hoc de Tukey-HSD. Diferenças estatísticas foram aceitas quando  $P \leq 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE CREATINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TSC

Camundongos Swiss machos ou fêmeas foram administrados com creatina por via oral sessenta minutos antes do TSC ou do TCA. A Figura 25 mostra que a creatina administrada em doses crescentes de 0,1-1000 mg/kg, p.o., induziu um efeito tipo-antidepressivo no teste da suspensão pela cauda em camundongos machos ( $F(6,47) = 6,30$ ;  $p < 0,01$ ) e fêmeas ( $F(6,56) = 7,10$ ;  $p < 0,01$ ), sem alterar os parâmetros locomotores no TCA (dados não mostrados).



**Figura 25.** Efeito do tratamento com creatina (0,01-1000 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TSC em camundongos. Cada coluna representa Média + EPM. \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle tratado com veículo (C).

### 5.1.1. Discussão

Existem diversas evidências demonstrando que o metabolismo energético está envolvido na fisiopatologia e tratamento da depressão (MORETTI, GORINI e VILLA, 2003). Em específico, vêm sendo demonstrado que o sistema creatina/fosfocreatina, cuja principal função é acoplar a síntese de ATP ao seu consumo em diversos processos celulares dependentes de ATP, é um importante alvo na depressão (ALLEN, 2012). Neste sentido, estudos reportam que níveis de creatina estão diminuídos em estruturas encefálicas de pacientes depressivos (ALLEN, 2012).

Além disso, diversas estratégias terapêuticas antidepressivas já se mostraram eficazes na modulação do sistema creatina/fosfocreatina cerebral, visto que compostos dotados de ação antidepressiva, tal como acetil-L-carnitina, aumentam os níveis cerebrais de fosfocreatina em pacientes com depressão (PETTEGREW *et al.*, 2002) e em camundongos (SMELAND *et al.*, 2012). Além disso, o antidepressivo desipramina reverte as diminuições nos níveis de creatina hipocámpais de camundongos submetidos ao estresse da natação forçada (KIM *et al.*, 2010).

Alguns estudos ressaltam que a suplementação com creatina pode promover uma melhora nos estados de humor de pacientes depressivos (AMITAL *et al.*, 2006; ROITMAN *et al.*, 2007; KONDO *et al.*, 2011; LYOO *et al.*, 2012; STRAKOWSKI, 2012). Consistente com os achados clínicos, nossos resultados mostram claramente que a creatina administrada sistematicamente por via oral é efetiva em reduzir o tempo de imobilidade no TSC, indicando uma propriedade antidepressiva deste composto ergogênico neste teste preditivo de ação antidepressiva. A administração de creatina em uma ampla faixa de doses (0,1-1000 mg/kg) mostrou similar efeito em camundongos fêmeas e machos submetidos ao TSC sem alterar a locomoção no teste do campo aberto.

O TSC é amplamente utilizado para avaliar a propriedade antidepressiva de novos agentes farmacológicos, por ser sensível a todas as principais classes de medicamentos antidepressivos, incluindo antidepressivos tricíclicos, ISRN e inibidores da enzima monoamina oxidase (STERU *et al.*, 1985), e é uma importante ferramenta para estudar os mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito antidepressivo. Neste teste os camundongos são colocados em uma condição aversiva inescapável e então apresentam uma

alternância entre dois tipos de comportamentos, agitação e imobilidade (STERU *et al.*, 1985). A imobilidade do TSC representa um fracasso da persistência no comportamento dirigido de escapar e é um comportamento modulado por tratamentos antidepressivos, visto que os mesmos diminuem o tempo de imobilidade no TSC (STERU *et al.*, 1985; CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005). Efeito "falso" positivo neste teste ocorre com intervenções psicoestimulantes devido ao aumento generalizado na atividade motora, que é controlada pela utilização de um teste adicional para mensurar ambulação dos animais. A redução no tempo de imobilidade induzida pela creatina no TSC não pode ser atribuída a uma ação psicoestimulante deste composto. Esta conclusão deriva do fato que em nosso estudo a creatina administrada por via p.o e i.c.v. (dados não mostrados) em doses que produziram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no TSC não alteram a atividade locomotora no TCA, em relação ao grupo controle.

Em nosso estudo a administração de creatina por via sistêmica (p.o.) produziu uma resposta antidepressiva em camundongos. Os nossos resultados estão em consonância com o fato que a administração sistêmica de creatina em roedores provoca vários efeitos no sistema nervoso central, como anticonvulsivante (ROYES *et al.*, 2006; MAGNI *et al.*, 2007) e melhora na memória espacial (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012). Além disso, uma única sistêmica administração de creatina aumentou o conteúdo total de creatina e fosfocreatina no estriado, bem como aumentou a atividade da enzima creatina cinase no cérebro de ratos (ROYES *et al.*, 2006; RAMBO *et al.*, 2013). Em concordância com estes achados, mostramos que a creatina administrada i.c.v. exerce efeito antidepressivo no TSC (dados não mostrados).

A administração aguda de cetamina e imipramina, compostos dotados de propriedade antidepressiva, promoveu um aumento na atividade da enzima creatina cinase no estriado, córtex cerebral e cerebelo (ASSIS *et al.*, 2009). Então, especulamos que o efeito antidepressivo da administração aguda de creatina (substrato da enzima creatina cinase) pode ser dependente ao menos em parte de uma modulação da atividade da enzima creatina cinase. Esta enzima é de extrema importância para o acoplamento dos sítios de produção de ATP aos sítios de utilização dos mesmos (ANDRES *et al.*, 2008). Assim, postulamos que o efeito antidepressivo da creatina

possa ser dependente de uma modulação do conteúdo de creatina cerebral e da atividade da enzima creatina cinase.

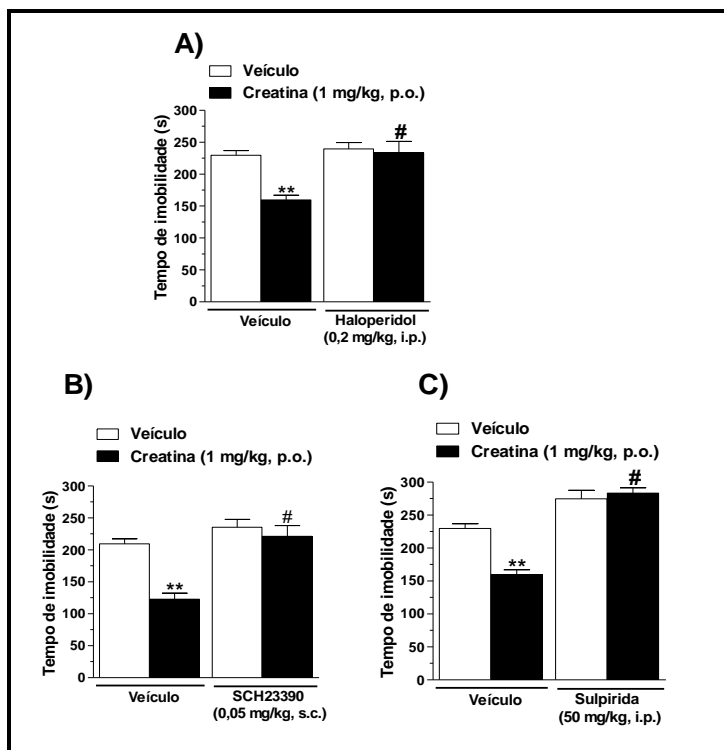
## 5.2. ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS $D_1$ E $D_2$ NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE CREATINA

Camundongos machos foram pré-tratados com haloperidol (Figura 26A, 0,2 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) ou SCH23390 (Figura 26B, 0,05 mg/kg, s.c., antagonista de receptores dopaminérgicos  $D_1$ ) ou sulpirida (Figura 26C, 50 mg/kg, i.p., antagonista de receptores  $D_2$ ) ou com seus respectivos veículos, 30 minutos antes do tratamento por via oral com creatina (1 mg/kg) ou veículo. O TSC e o TCA foram realizados sessenta minutos depois da administração de creatina. O pré-tratamento com haloperidol ou SCH23390 ou sulpirida foi capaz de bloquear o efeito antidepressivo da administração de creatina no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento com haloperidol ( $F(1,28) = 13,35$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,28) = 11,00$ ;  $p < 0,01$ ) e para a interação haloperidol  $\times$  creatina ( $F(1,28) = 7,74$ ;  $p < 0,01$ ). A ANOVA de duas vias também demonstrou diferenças significativas para o tratamento com SCH23390 ( $F(1,36) = 26,76$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,36) = 17,38$ ;  $p < 0,01$ ) e para a interação entre SCH23390  $\times$  creatina ( $F(1,36) = 9,05$ ;  $p < 0,01$ ). Ainda a ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com sulpirida ( $F(1,28) = 83,08$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,28) = 11,01$ ;  $p < 0,01$ ) e para a interação entre sulpirida  $\times$  creatina ( $F(1,28) = 18,06$ ;  $p < 0,01$ ). O efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC parece não se correlacionar com efeitos motores, visto que a administração de creatina não alterou o número de cruzamentos no TSC ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

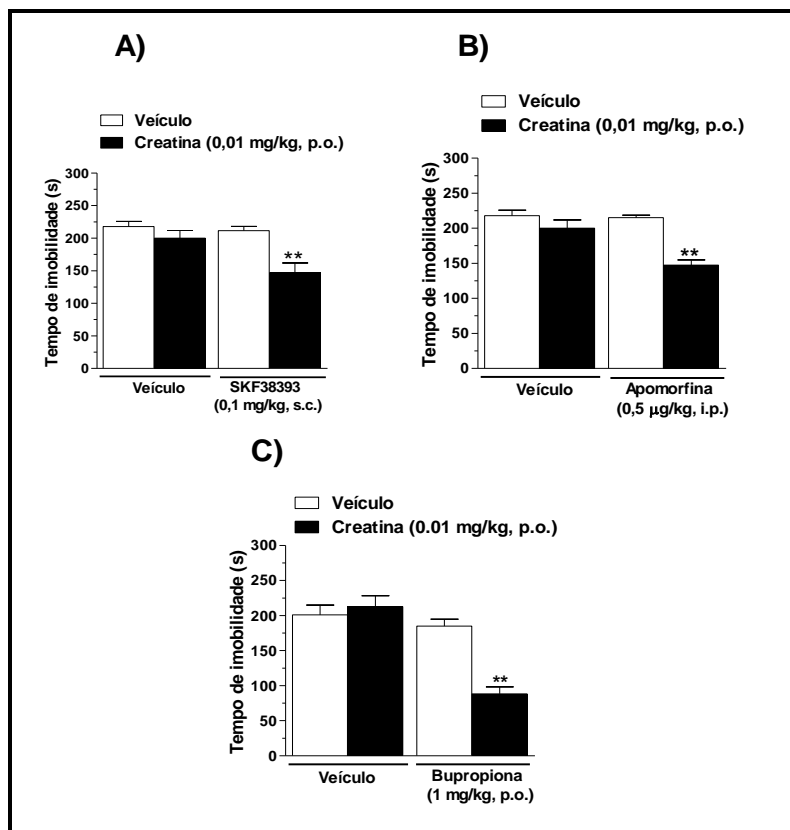
Ainda os animais foram pré-tratados com dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo e trinta minutos depois receberam uma administração de SKF38393 (Figura 27A, 0,1 mg/kg, s.c., seletivo agonista de receptores dopaminérgicos  $D_1$ ) ou apomorfina (Figura 27B, 0,5  $\mu$ g/kg, i.p., um agonista não seletivo de receptores dopaminérgicos que preferencialmente ativa os receptores dopaminérgicos  $D_2$ ) ou com o respectivo veículo. Os animais foram submetidos ao TSC e ao TCA 30 minutos após o tratamento com os agonistas dopaminérgicos. Em um protocolo independente, os animais foram coadministrados com creatina e bupropiona em doses sub-efetivas e 60 minutos após as administrações foram submetidos

ao TSC ou ao TCA (Figura 27C). SKF38393 ou apomorfina ou bupropiona administrados em doses sub-efetivas em conjunto com uma dose sub-efetiva de creatina apresentam efeito antidepressivo sinérgico no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa para o tratamento com SKF38393 ( $F(1,38) = 9,21$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,38) = 17,13$ ;  $p < 0,01$ ), e para a interação creatina  $\times$  SKF 38393 ( $F(1,38) = 4,52$ ;  $p < 0,01$ ). Também, a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa para o tratamento com apomorfina ( $F(1,34) = 14,24$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,34) = 28,89$ ;  $p < 0,01$ ), e para a interação creatina  $\times$  apomorfina ( $F(1,34) = 9,45$ ;  $p < 0,01$ ). Ainda, a ANOVA de duas vias também demonstrou diferença significativa para o tratamento com bupropiona ( $F(1,30) = 31,13$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,30) = 11,51$ ;  $p < 0,01$ ) e para a interação bupropiona  $\times$  creatina ( $F(1,30) = 18,57$ ;  $p < 0,01$ ). Os resultados apresentados parecem não ser devido a alterações locomotoras ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).





**Figura 26. Envolvimento da ativação dopaminérgica no efeito tipo-antidepressivo da creatina.** Efeito do pré-tratamento com haloperidol (0,2 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos), SCH23390 (0,05 mg/kg, s.c., um seletivo antagonista de receptores dopaminérgicos  $D_1$ ) e sulpirida (50 mg/kg, i.p., um seletivo antagonista de receptores dopaminérgicos  $D_2$ ) no efeito tipo-antidepressivo da creatina (1 mg/kg, p.o., Painéis A, B e C) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\* $P < 0,01$ , comparado com o grupo controle tratado com veículo, e # $P < 0,05$  comparado com o grupo tratado com creatina.



**Figura 27. Interação de creatina com ativadores da neurotransmissão dopaminérgica no TSC.** Efeito da combinação de creatina em dose subefetiva (0,01 mg/kg, p.o.) e SKF28293 (0,1 mg/kg, s.c., agonista de receptores dopaminérgico D<sub>2</sub>, Painei A), ou apomorfina (0,5 µg/kg, s.c., um agonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, Painei B), ou bupropiona (1 mg/kg, p.o., inibidor da recaptação de dopamina, Painei C) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle tratado com veículo.

### 5.2.1. Discussão

A dopamina é um neurotransmissor amplamente associado a vias de recompensas mesolímbicas que modulam comportamentos de hedonia e anedonia. Desta forma, vem sendo proposto que um aumento na neurotransmissão dopaminérgica poderia estar atuando terapeuticamente frente à anedonia, principal sintoma atribuído à depressão (D'AQUILA *et al.*, 2000). Nossos estudos tem reportado que a dopamina é um importante alvo na ação de agentes antidepressivos (MACHADO *et al.*, 2007, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009; BINFARE *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2010). Além disso, evidências sugerem que pacientes com depressão e esquizofrenia, outra patologia bastante associada a uma disfunção dopaminérgica, apresentam uma considerável diminuição dos níveis de creatina cerebral (KATO *et al.*, 1992; DAGER *et al.*, 2004; ONGUR *et al.*, 2009). Reforçando a relação entre creatina e sistema dopaminérgico, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* reportaram um papel neuroprotetor da creatina contra a morte celular induzida por neurotoxinas dopaminérgicas MPTP/MPP<sup>+</sup> (MATTHEWS *et al.*, 1999; ANDRES *et al.*, 2005b,c). Além disso, a suplementação com creatina por sete dias foi capaz de aumentar os níveis de dopamina e melhorar o humor. A partir destas evidências, investigamos a influência do sistema dopaminérgico no efeito antidepressivo da creatina.

O presente resultado sugere que o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC é ao menos em parte dependente da interação com o receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>, uma vez que o tratamento de camundongos com haloperidol ou SCH23390 preveniu o efeito tipo-antidepressivo induzido pela creatina no TSC. Nossos recentes estudos tem reportado que SCH23390 preveniu o efeito tipo-antidepressivo de compostos com propriedades antidepressivas no TSC (MACHADO *et al.*, 2007, 2009; BINFARE *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2010). As propriedades tipo-antidepressiva de antidepressivos de distintas classes (inibidores da enzima monoamina oxidase B, tricíclicos, ISRS, inibidores da captação de dopamina) foram prevenidas pelo tratamento com SCH23390 em testes preditivos de ação antidepressiva (GAMBARANA *et al.*, 1995; RENARD *et al.*, 2001; BINFARE *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2011). Além disso, agonistas de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> apresentam efeito tipo-antidepressivo no TNF (D'AQUILA *et al.*, 1994), corroborando com os nossos dados em que SKF38393 apresentou efeito tipo-antidepressivo no TSC e este efeito foi

revertido pela administração de SCH23390. Nossos resultados indicam ainda que creatina administrada em sua dose sub-efetiva exerce um efeito anti-imobilidade sinérgico quando associada com uma dose sub-efetiva de SKF38393. Nossos resultados estão em acordo com um estudo que demonstrou que o agonista de receptores dopaminérgicos  $D_1$  SKF38393 produz efeito antidepressivo sinérgico quando associado a distintos antidepressivos no TNF (RENARD *et al.*, 2001).

Nossos resultados sugerem ainda que o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC é dependente de uma interação com os receptores dopaminérgicos  $D_2$ , visto que o pré-tratamento de camundongos com haloperidol ou sulpirida preveniu o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de creatina. Nossos recentes estudos também demonstram que sulpirida previne o efeito antidepressivo de agentes com propriedades antidepressivas no TSC (MACHADO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2009; BINFARE *et al.*, 2010; CAPRA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2010). Além disso, estudos demonstram que sulpirida previne o efeito tipo-antidepressivo de dois inibidores da recaptação de dopamina, bupropiona e nomifensina, no TNF (YAMADA, SUGIMOTO e YAMADA, 2004; MELO *et al.*, 2011). Outra intervenção antidepressiva através de choques eletroconvulsivos induz um efeito antidepressivo no TSC e este foi prevenido pela administração de sulpirida (TESTE, MARTIN e RINJARD, 1990). O estimulador de receptores dopaminérgicos  $D_2$  LY171555 reduziu o tempo de imobilidade no TNF. Em concordância o nosso estudo reportou que o agonista de receptores dopaminérgicos  $D_2$  produziu efeito antidepressivo e este foi revertido pelo pré-tratamento com sulpirida (dados não mostrados). Um estudo clínico também demonstrou que o agonista seletivo de receptores dopaminérgicos  $D_2$  bromocriptina foi efetivo na depressão resistente a antidepressivos tricíclicos e heterocíclicos (INOUE *et al.*, 1996). Além disso, nossos resultados demonstram que a creatina quando administrada em dose sub-efetiva quando associada à administração de uma dose sub-efetiva de apomorfina apresenta efeito antidepressivo no TSC.

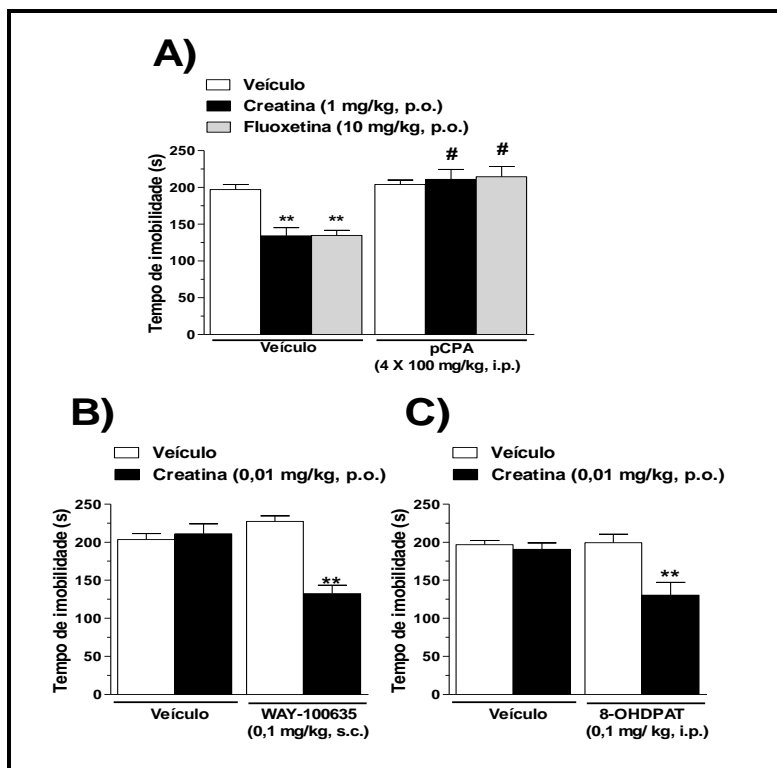
### 5.3. ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA

Camundongos machos foram pré-tratados com PCPA, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase que participa na via de síntese de 5-HT (Figura 28A, 4 x 100 mg/kg, i.p., uma vez ao dia). Creatina, fluoxetina ou veículo foram administrados 60 minutos antes dos testes comportamentais. O TSC ou o TCA foram realizados 24 após a última administração de PCPA ou veículo. Em camundongos pré-tratados com PCPA a administração de creatina ou fluoxetina não produziu efeito tipo-antidepressivo no TSC. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do tratamento com PCPA ( $F(1,43) = 43,33$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(2,43) = 4,79$ ;  $p < 0,05$ ) e da interação PCPA  $\times$  creatina ( $F(2,43) = 8,36$ ;  $p < 0,01$ ). O efeito do tratamento com PCPA na ação antidepressiva da creatina não pode ser atribuída a alterações na atividade locomotora dos animais ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

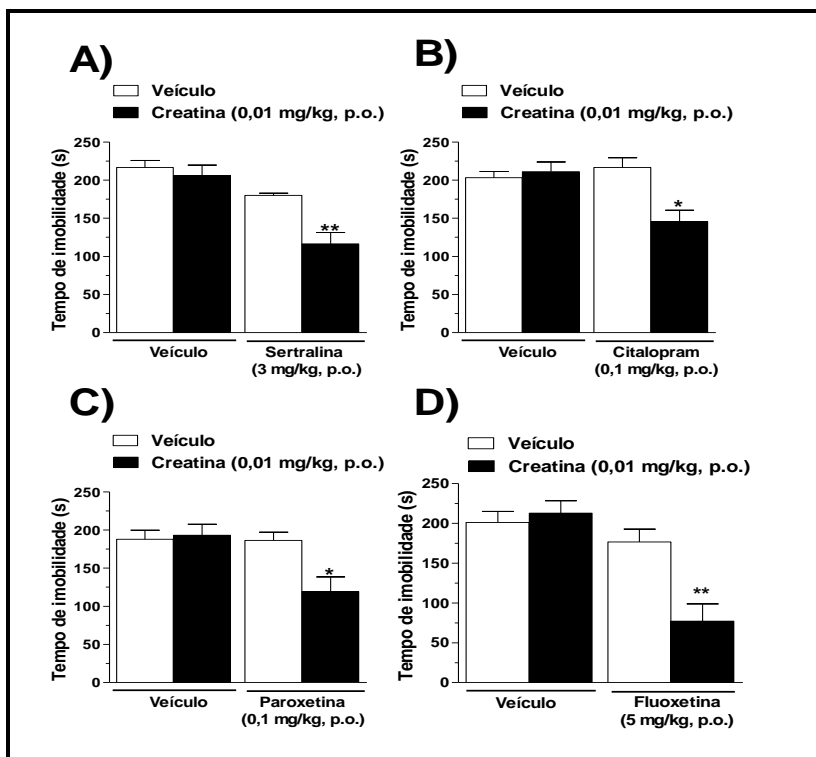
Ainda os animais foram pré-tratados com dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo e trinta minutos depois receberam uma administração de WAY100635 (Figura 28B, 0,1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>), 8-OHDPAT (Figura 28C, 0,1 mg/kg, i.p., um agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>) ou respectivos veículos. Os animais foram submetidos ao TSC ou ao TCA 30 minutos após o tratamento. Creatina em uma dose sub-efetiva quando combinada com doses sub-efetivas de WAY100635 e 8-OHDPAT apresentou um efeito antidepressivo sinérgico. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento com creatina ( $F(1,32) = 19,35$ ;  $p < 0,01$ ), WAY100635 ( $F(1,32) = 7,68$ ;  $p < 0,05$ ) e para a interação creatina  $\times$  WAY100635 ( $F(1,32) = 26,90$ ;  $p < 0,01$ ). Além disso, a ANOVA de duas vias também revelou um efeito significativo do tratamento com creatina ( $F(1,29) = 11,32$ ;  $p < 0,01$ ), 8-OH-DPAT ( $F(1,29) = 6,67$ ;  $p < 0,05$ ) e da interação creatina  $\times$  8-OH-DPAT ( $F(1,29) = 7,86$ ;  $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados parecem não ser devido a alterações locomotoras, visto que nenhuma alteração no TCA foi observada ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

Além disso, o efeito da interação entre creatina e ISRS sobre o tempo de imobilidade no TSC foi verificado (Figura 29D-G). Os animais foram co-tratados com dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo e imediatamente os animais receberam uma dose sub-efetiva dos ISRS fluoxetina, paroxetina, citalopram ou sertralina. Os animais foram submetidos ao TSC ou ao TCA 60

minutos após o co-tratamento. Doses sub-efetivas de fluoxetina (5 mg/kg, p.o.), paroxetina (0,1 mg/kg, p.o.), citalopram (0,1 mg/kg, p.o.) ou sertralina (3 mg/kg, p.o.) causaram um potente efeito tipo-antidepressivo no TSC quando combinadas com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.), quando comparado com o controle ou com os fármacos administrados isoladamente. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com fluoxetina ( $F(1,29) = 22,22$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,29) = 6,73$ ;  $p < 0,01$ ) e da interação fluoxetina  $\times$  creatina ( $F(1,29) = 10,71$ ;  $p < 0,01$ ). A ANOVA de duas vias também revelou um efeito significativo do tratamento com paroxetina ( $F(1,28) = 4,59$ ;  $p < 0,05$ ), creatina ( $F(1,28) = 6,72$ ;  $p < 0,05$ ) e da interação paroxetina  $\times$  creatina ( $F(1,28) = 6,24$ ;  $p < 0,05$ ). Ainda a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com citalopram ( $F(1,30) = 6,77$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,30) = 4,60$ ;  $p < 0,05$ ) e da interação citalopram  $\times$  creatina ( $F(1,30) = 10,53$ ;  $p < 0,05$ ). Por fim, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com sertralina ( $F(1,32) = 29,42$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,32) = 10,06$ ;  $p < 0,01$ ) e da interação sertralina  $\times$  creatina ( $F(1,32) = 5,23$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, o número de cruzamentos no TCA não foi alterado pela administração de creatina e/ou fluoxetina e/ou paroxetina e/ou citalopram e/ou sertralina (dados não mostrados).



**Figura 28. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg, i.p., uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos, inibidor da enzima triptofano hidroxilase) no efeito tipo antidepressivo da creatina (1 mg/kg, p.o., Painel A) e o efeito da combinação de creatina em dose sub-efetiva (0,01 mg/kg, p.o.) e WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., um antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, Painel B) ou 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico, Painel C) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle tratado com veículo. #P<0,01 comparado com o respectivo grupo (creatina ou fluoxetina) pré-tratados com o veículo.



**Figura 29. Interação de creatina e ISRS no TSC.** Efeito da combinação de creatina em dose sub-efetiva (0,01 mg/kg, p.o.) e sertralina (3 mg/kg, p.o., Painel A), ou citalopram (0,1 mg/kg, p.o., Painel B), ou paroxetina (0,1 mg/kg, p.o., Painel C) ou fluoxetina (5 mg/kg, p.o., Painel D) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle tratado com veículo.



### 5.3.1. Discussão

Uma desregulação no sistema serotoninérgico tem sido extensivamente correlacionada com a fisiopatologia da depressão e a maioria dos antidepressivos disponíveis promove a ativação de tal sistema de neurotransmissão (ELHWUEGI, 2004; MILLAN, 2004). Assim, hipotetizamos que o efeito tipo-antidepressivo da creatina poderia ser mediado por uma ativação do sistema serotoninérgico.

Inicialmente, investigamos se o pré-tratamento com PCPA, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, seria efetivo em reverter o efeito tipo antidepressivo induzido pela creatina no TSC. Estudos reportam que o PCPA produz uma significativa depleção dos níveis de 5-HT cortical em ratos (93%) e em camundongos (67-70%) (CESANA *et al.*, 1993; PAGE *et al.*, 1999; O'LEARY *et al.*, 2007). Os nossos resultados claramente mostram que o pré-tratamento com PCPA aboliu o efeito anti-imobilidade induzido pela creatina no TSC. A administração de PCPA no mesmo protocolo utilizado em nosso estudo reverteu à ação antidepressiva da fluoxetina no TNF (KASTER, SANTOS e RODRIGUES, 2005; BROCARD *et al.*, 2008) e no TSC (RODRIGUES *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2009), mas não foi hábil em reverter o efeito tipo-antidepressivo da imipramina no TSC (RODRIGUES *et al.*, 2002). A reversão do efeito tipo-antidepressivo da creatina pela depleção de 5-HT induzida pelo pré-tratamento com PCPA sugere que o efeito antidepressivo da creatina é dependente de uma biodisponibilidade de 5-HT no espaço sináptico, efeito este similar à fluoxetina. Em concordância, a suplementação com creatina em ratos aumentou o tempo de natção dos ratos no TNF, um perfil comportamental associado com um mecanismo de ação serotoninérgico (ALLEN *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento com acetil-L-carnitina, composto com atividade antidepressiva no TNF, aumenta os níveis de fosfocreatina e a relação fosfocreatina/creatina associado com aumentos nos níveis de 5-HT no córtex cerebral de camundongos (PULVIRENTI *et al.*, 1990; SMELAND *et al.*, 2012).

Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão sendo amplamente associados com alterações no humor. Estes receptores podem se apresentar como um autoreceptor somatodendrítico pré-sináptico e um heteroreceptor pós-sináptico (ALBERT, 2012). O bloqueio de autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> potencia a função serotoninérgica pré-sináptica por prevenir as ações autoinibitórias de 5-HT no disparo e liberação de neurônios serotoninérgicos, sem alterar as respostas hipocampusais pós-sináptica que podem contribuir para um efeito antidepressivo

(ARTIGAS, PEREZ e ALVAREZ, 1994; ARTIGAS *et al.*, 1996). Em concordância com estes achados, alguns estudos clínicos tem demonstrado que a coadministração do antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> combinado com ISRS acelera o início do efeito antidepressivo (ARTIGAS, PEREZ e ALVAREZ, 1994). O presente estudo indica um envolvimento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC, visto que a administração de WAY100635, um antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos, potencia a ação tipo-antidepressiva da creatina no TSC. WAY100635 sinergicamente potencia os incrementos de 5-HT produzido por antidepressivos serotoninérgicos (ROMERO, HERVAS e ARTIGAS, 1996). Em concordância com estes achados, a combinação de WAY100635 com uma dose sub-efetiva de compostos dotados de propriedade antidepressiva, incluindo fluoxetina, significativamente reduzem o tempo de imobilidade no TNF em ratos (TATARCZYNSKA *et al.*, 2002) e em camundongos (KASTER, SANTOS e RODRIGUES, 2005; BROCARD *et al.*, 2008). Uma possibilidade que pode ocorrer para a potenciação do efeito antidepressivo da creatina no TSC pela administração de WAY100635 é que o bloqueio de autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos com subsequente aumento na liberação de 5-HT causado por este antagonista pode potencializar o aumento da biodisponibilidade de 5-HT induzida pela creatina, causando um efeito tipo-antidepressivo.

Os heteroreceptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos são receptores extremamente abundantes no sistema nervoso central e medeiam as ações de 5-HT em neurônios alvos, sendo implicados na regulação do humor, emoção e respostas ao estresse (ALBERT, 2012). Em nosso estudo, demonstramos que o agonista seletivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sináptico 8-OH-DPAT administrado em altas doses induziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC (dados não mostrados). O nosso estudo está de acordo com outros estudos que reportaram efeito antidepressivo de 8-OH-DPAT no TNF em camundongos e ratos (LOPEZ-RUBALCAVA e LUCKI, 2000; O'NEILL e CONWAY, 2001). Digno de nota, o tratamento com neurotoxinas serotoninérgicas 5,7-dihidroxitriptamina ou PCPA, que são propostas atuarem pré-sinápticamente, não revertem o efeito anti-imobilidade induzido por 8-OH-DPAT no TNF, sugerindo que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos medeiam o efeito tipo-antidepressivo deste agonista (LUSCOMBE *et al.*, 1993). Além disso, 8-OH-DPAT potencia a atividade antidepressiva de

antidepressivos no TNF (REDROBE, MACSWEENEY e BOURIN, 1996), possivelmente via ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos. Tem sido reportado, ainda, que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos produz mudanças similares às encontradas depois da administração de antidepressivos convencionais (LUCKI, 1991). Além disso, um efeito tipo antidepressivo sinérgico foi observado em camundongos tratados com doses sub-efetivas de creatina em combinação com 8-OH-DPAT, sugerindo que uma ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos está implicada no efeito da creatina no TSC.

Os ISRS são os antidepressivos mais prescritos em todo o mundo (STAHL, 1998), embora o seu uso cause efeitos adversos, tais como a disfunção sexual, sono, e ganho de peso (CASCADE, KALALI e KENNEDY, 2009). No entanto, as combinações de antidepressivos com várias substâncias pode aumentar a eficácia do antidepressivo, minimizando os efeitos colaterais (NELSON, 2007). O presente estudo investigou os efeitos da administração combinada de ISRS com creatina, todos em doses que, por si só não produzem efeito antidepressivo no TSC. Um efeito sinérgico de antidepressivos como fluoxetina, paroxetina, citalopram e sertralina com a creatina foram mostrados.

De forma semelhante, um estudo recente demonstrou que a creatina produziu um efeito antidepressivo sinérgico com fluoxetina no TNF em ratos (ALLEN *et al.*, 2012). Além disso, nossos dados estão em linha com um estudo clínico que relatou que a terapia combinada com fluoxetina e creatina, por oito semanas, produziu um aumento na concentração de fosfocreatina no encéfalo associada a um declínio nos escores de depressão na escala de classificação de depressão em adolescentes do sexo feminino resistentes ao tratamento com ISRS (KONDO *et al.*, 2011; LYOO *et al.*, 2012). Digno de nota, o nosso estudo claramente estende os dados da literatura mostrando que a creatina além de produzir uma ação tipo antidepressiva sinérgica quando combinada com o antidepressivo fluoxetina, também exerce este efeito quando associada com outros antidepressivos ISRS como paroxetina, citalopram e sertralina, um fato que pode ter uma grande implicação terapêutica.

#### 5.4. PARTICIPAÇÃO DOS $\alpha_1$ -ADRENOCEPTORES NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA

Para testar a hipótese de que o efeito antidepressivo da creatina é mediado através do sistema noradrenérgico, animais foram pré-tratados com AMPT (100 mg/kg, um inibidor da enzima tirosina hidroxilase), 4 horas antes da administração de creatina (1 mg/kg, p.o.). Os resultados mostrados na Figura 30A mostram que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi impedido pelo pré-tratamento de camundongos com o inibidor da enzima tirosina hidroxilase, AMPT (100 mg/kg, i.p.), no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com AMPT ( $F(1,27) = 29,17$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,27) = 19,44$ ;  $p < 0,01$ ) e para a interação AMPT  $\times$  creatina ( $F(1,27) = 4,52$ ;  $p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com AMPT e/ou creatina ( $P > 0,05$ , dados não mostrados).

Os resultados apresentados na Figura 30B mostram que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi bloqueado pelo pré-tratamento dos camundongos com o antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, prazosina (1 mg/kg, i.p.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com prazosina ( $F(1,25) = 9,87$ ;  $p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,27) = 5,97$ ;  $p < 0,05$ ) e para a interação prazosina  $\times$  creatina ( $F(1,25) = 5,92$ ;  $p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com creatina e/ou prazosina ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

A fenilefrina, um agonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, administrado em uma dose sub-efetiva (0,4  $\mu$ g/sítio, i.c.v.), exibiu um potente efeito tipo-antidepressivo quando combinado com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) no TSC em camundongos, em comparação com o controle (Figura 30C). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,29) = 25,65$ ;  $p < 0,01$ ), fenilefrina ( $F(1,29) = 55,37$ ;  $p < 0,01$ ), e para a interação creatina  $\times$  fenilefrina ( $F(1,29) = 6,97$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, o número de cruzamentos no TCA não foi alterado pela administração de creatina e/ou fenilefrina (dados não mostrados).

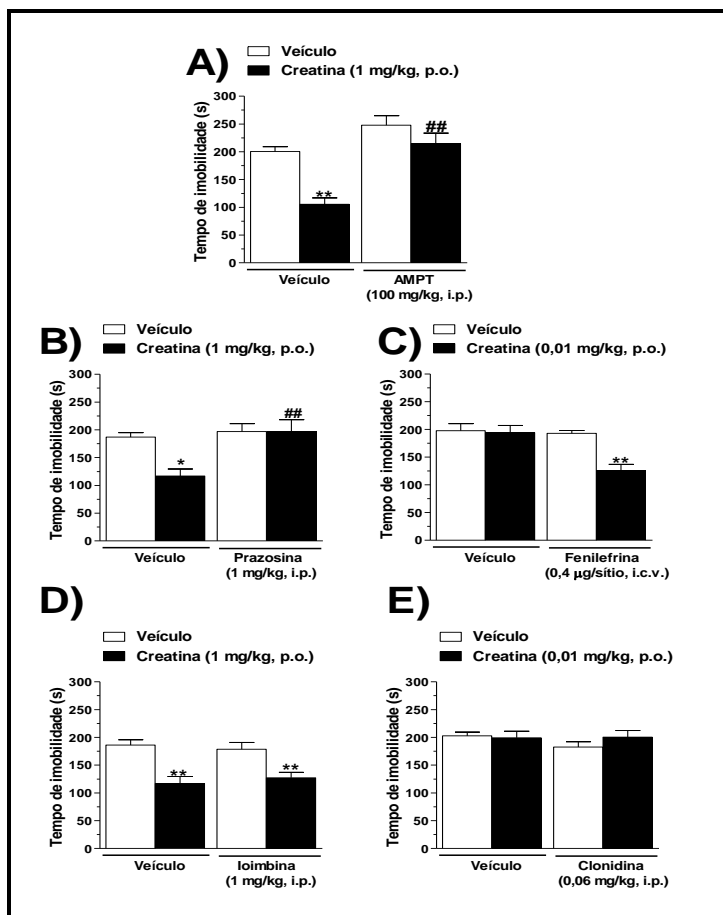
O resultado representado na Figura 31A mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) não foi bloqueado pelo pré-tratamento de camundongos com ioimbina, um antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico (1 mg/kg, i.p.), no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com

creatina ( $F(1,24) = 26,26; p < 0,01$ ), mas não para ioimbina e para a interação ioimbina  $\times$  creatina. O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo pré-tratamento com ioimbina e creatina de tratamento ( $P > 0,05$ , dados não mostrados).

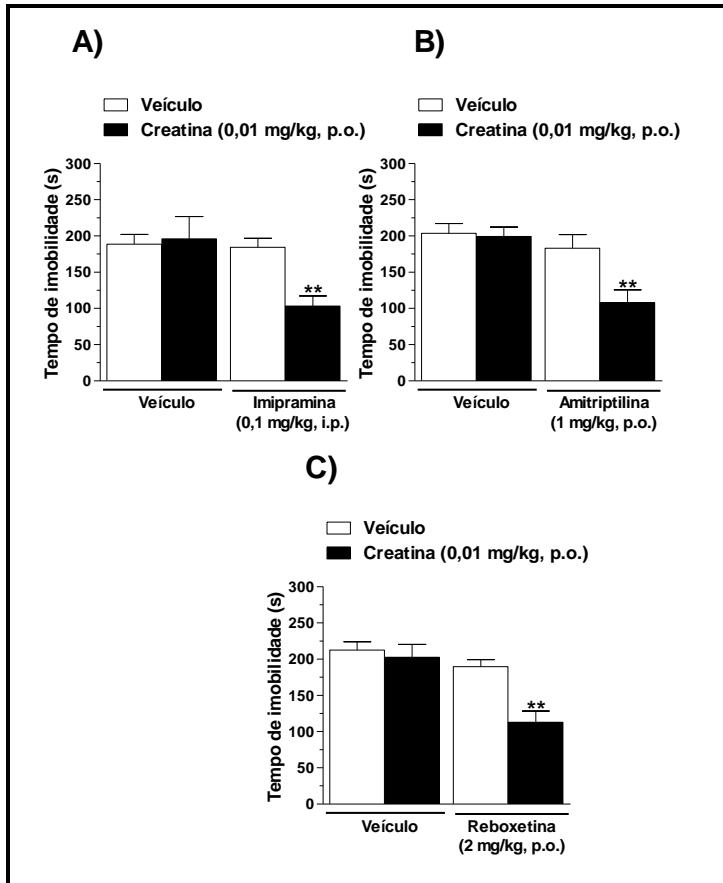
O antidepressivo tricíclico amitriptilina administrado em uma dose sub-efetiva (1 mg/kg, p.o.), exibiram um potente efeito antidepressivo quando combinado com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.), no TSC, em comparação com o grupo controle ou em relação a cada fármaco isoladamente (Figura 31C). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com amitriptilina ( $F(1,27) = 12,35; p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,27) = 6,25; p < 0,05$ ), e para a interação amitriptilina  $\times$  creatina ( $F(1,27) = 4,95; p < 0,05$ ). Além disso, o número de cruzamentos no TCA não foi alterado pela coadministração de creatina com amitriptilina ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

Além disso, a imipramina, um antidepressivo tricíclico administrado em uma dose sub-efetiva (0,1 mg/kg, p.o.), exibiu um efeito antidepressivo quando combinada com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) no TSC comparado com o grupo controle (Figura 31D). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com imipramina ( $F(1,22) = 4,89; p < 0,05$ ), creatina ( $F(1,22) = 8,50; p < 0,01$ ), e para a interação imipramina  $\times$  creatina ( $F(1,22) = 7,06; p < 0,05$ ). Além disso, o número de cruzamentos no TCA não foi alterado pela coadministração de creatina e imipramina ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

Além disso, a reboxetina administrada em uma dose sub-efetiva (2 mg/kg, p.o.), exibiu um potente efeito antidepressivo sinérgico quando combinada com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.), em comparação com o grupo controle (Figura 31E). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com reboxetina ( $F(1,26) = 19,85; p < 0,01$ ), creatina ( $F(1,26) = 11,68; p < 0,01$ ) e para a interação reboxetina  $\times$  creatina ( $F(1,26) = 6,95; p < 0,05$ ). Além disso, o tratamento com reboxetina, mas não em combinação com a creatina, reduziu a atividade locomotora dos camundongos no TCA ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).



**Figura 30. Envolvimento dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento com AMPT (100 mg/kg, i.p., um inibidor da enzima tirosina hidroxilase, Painel A), prazosina (1 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, Painel B) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico, Painel D) no efeito tipo antidepressivo da creatina (1 mg/kg, p.o.) no TSC e o efeito da combinação de doses sub-efetivas de fenilefrina (antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico, 0,4 µg/sítio, i.c.v., Painel C) ou clonidina (0,06 mg/kg, i.p., um agonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, Painel E) e creatina (0,01 mg/kg, p.o.) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle tratado com veículo. ## $P < 0,01$  comparado com o grupo salina/creatina.



**Figura 31. Interação entre creatina e antidepressivos inibidores da receptação de noradrenalina no TSC.** Efeito da combinação de creatina em dose sub-efetiva e amitriptilina (1 mg/kg, p.o., um antidepressivo tricíclico, Painei A), ou imipramina (0,1 mg/kg, p.o., um antidepressivo tricíclico, Painei B), ou reboxetina (2 mg/kg, p.o., um ISRN, Painei C) no tempo de imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle tratado com veículo.

### 5.4.1. Discussão

Os resultados aqui apresentados indicam que a creatina produz efeito antidepressivo dependente, pelo menos em parte, da ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico. Curiosamente, também mostramos que a creatina apresenta efeito adjuvante quando associada com amitriptilina, imipramina e reboxetina, antidepressivos que inibem o transportador de NA.

Na década de 1960, um consenso que as catecolaminas, especificamente NA, desempenhavam um papel importante, possivelmente primário, na fisiopatologia e subsequente tratamento de transtornos de humor (BUNNEY e DAVIS, 1965; BRUNELLO *et al.*, 2002). Além disso, o tratamento com antidepressivos ISRN e agentes serotoninérgicos causam uma diminuição no “*turn over*” de NA (JAVOID, HENDRICKS e DAVIS, 1983; POTTER *et al.*, 1985; DE BELLIS *et al.*, 1993). Estudos recentes têm implicado o sistema no adrenérgico como um dos alvos importantes na ação de compostos antidepressivos (KASTER *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2009). Além disso, o tratamento com acetila-L-cantina, um composto dotado de ação tipo-antidepressiva no TNF, aumenta os níveis de creatina fosfato e a taxa creatina fosfato/creatina associada com um aumento nos níveis de NA no córtex cerebral de camundongos (PULVIRENTI *et al.*, 1990; DI CESARE MANNELLI *et al.*, 2011; SMELAND *et al.*, 2012). No presente trabalho, o pré-tratamento dos camundongos com AMPT foi capaz de bloquear o efeito anti-imobilidade da creatina no TSC, um efeito similar ao observado com o ISRN, reboxetina. Estes resultados sugerem que o efeito da creatina no TSC pode ser dependente de um aumento na biodisponibilidade de NA na fenda sináptica. O paradigma de depleção de NA é utilizado com sucesso para investigar o mecanismo de ação de antidepressivos em estudos no pré-clínicos e clínicos (MILLER *et al.*, 1996a; MILLER *et al.*, 1996b; KASTER *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008).

Estudos relataram a capacidade do inibidor seletivo da enzima tirosina hidroxilase AMPT em reduzir os níveis de dopamina e NA (57% e 53%, respectivamente) em ratos, sem afetar os níveis de 5-HT (MAYORGA *et al.*, 2001). Além disso, AMPT gerou um reaparecimento dos sintomas de depressão em pacientes deprimidos tratados com ISRN, mas não os pacientes tratados com ISRS (MILLER *et al.*, 1996a; MILLER *et al.*, 1996b; BREMNER *et al.*, 2003). Além disso, a administração aguda de AMPT



temporariamente impediu o efeito antidepressivo da desipramina, mazindol e da mirtazapina em pacientes (MILLER *et al.*, 1996a; MILLER *et al.*, 1996b; DELGADO *et al.*, 2002). O nosso grupo também relatou que a administração de AMPT na mesma dose empregue no presente estudo reverteu à ação antidepressiva de alguns compostos farmacológicos, tais como a lamotrigina e rutina, no TNF e TSC, respectivamente (KASTER *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2008). Não excluimos a possibilidade de que o efeito do AMPT em suprimir a propriedade antidepressiva da creatina seja devido, ao menos em parte, a uma diminuição dos níveis de dopamina, uma vez que em experimentos prévios demonstramos que o efeito antidepressivo da creatina pode ser mediado pela ativação do sistema dopaminérgico.

Estudos básicos sobre os efeitos dos antidepressivos nos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico apoiam a noção de uma disfunção dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico na depressão. Muitos autores relatam que o tratamento com antidepressivos tricíclicos aumenta ou densidade (VETULANI *et al.*, 1984; MAJ *et al.*, 2000; VETULANI e NALEPA, 2000), a afinidade ao agonista (MENKES, AGHAJANIAN e GALLAGER, 1983; MAJ *et al.*, 2000), a resposta electrofisiológica (MENKES, AGHAJANIAN e MCCALL, 1980), e as respostas comportamentais mediadas pelos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (MENKES, AGHAJANIAN e GALLAGER, 1983). O presente estudo sugere que o efeito antidepressivo da creatina no TSC é dependente, pelo menos em parte, de uma ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico, uma vez que o pré-tratamento de camundongos com prazosina (antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico) significativamente impediu o efeito antidepressivo evocado pela creatina no TSC. Em consonância com isso, prazosina impediu o efeito antidepressivo de compostos antidepressivos no TSC (BINFARE *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2009; CAPRA *et al.*, 2010). Além disso, a ação antidepressiva de desipramina no TNF foi bloqueada pelo pré-tratamento de camundongos com prazosina (DANYSZ *et al.*, 1986). Além disso, o agonista receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina produziu um efeito anti-imobilidade no TNF (KITADA *et al.*, 1983), de acordo com o presente estudo que mostra um efeito antidepressivo produzido por fenilefrina no TSC, que foi impedido pelo tratamento prévio de camundongos com prazosina (dados não mostrados). Além disso, os resultados aqui apresentados indicam que a creatina administrada em uma dose sub-efetiva exerce um efeito anti-imobilidade sinérgico no TSC quando associada com

uma dose de fenilefrina sub-efetiva, reforçando a hipótese de que a creatina exerce um efeito antidepressivo por, direta ou indiretamente ativar os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico.

Os nossos resultados também sugerem que o efeito da creatina no TSC não é dependente de uma interação com o receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico, considerando que o pré-tratamento dos camundongos com ioimbina (um antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico) não impediu o efeito antidepressivo evocado pela creatina no TSC. Curiosamente, a ação tipo-antidepressiva de alguns compostos com propriedades antidepressivas não é bloqueada pela ioimbina (MACHADO *et al.*, 2009; YI *et al.*, 2011).

Tendo em conta que: (i) os receptores adrenérgicos podem ser fisiologicamente ativados pela dopamina (ZHANG, OUYANG e THOMAS, 2004), (ii) o receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico apresenta um sistema de neurônios aferentes dopaminérgicos (LIPINSKI *et al.*, 1987), (iii) os ISRN podem aumentar as concentrações extracelulares de dopamina no córtex pré-frontal (CARBONI *et al.*, 1990; TANDA *et al.*, 1994), (iv) o efeito antidepressivo da creatina no TSC envolve ativação dopaminérgica, não podemos descartar a possibilidade de que algumas das ações da creatina no TSC podem ser mediadas por uma interação entre os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico.

Os transportadores de NA localizados na membrana plasmática de neurônios noradrenérgicos são responsáveis pela rápida recaptação neuronal de NA nos terminais pré-sinápticos. O transportador de NA é crítico para os efeitos comportamentais e alterações fisiológicas, incluindo a regulação do humor (BONISCH e BRUSS, 2006). Os transportadores de NA são um alvo para os antidepressivos tais como amitriptilina, imipramina e reboxetina, que são utilizados clinicamente para o tratamento da depressão (HAENISCH e BONISCH, 2011). Imipramina e amitriptilina são inibidores duais da recaptação de 5-HT e NA (CARRODI e FUXE, 1968; RICHELSON e PFENNING, 1984), enquanto que a reboxetina é um ISRN usado no tratamento da depressão (KASPER, EL GIAMAL e HILGER, 2000; HAJOS *et al.*, 2004). No presente estudo, amitriptilina, imipramina e reboxetina foram eficazes na redução do tempo de imobilidade no TSC. O TSC é amplamente utilizado para avaliar as propriedades antidepressivas de novas intervenções farmacológicas ou não, por ser sensível a todas as principais classes de antidepressivos, incluindo antidepressivos tricíclicos e os ISRN (STERU *et al.*, 1985; CALDARONE *et al.*,

2004; O'LEARY *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2008). No presente estudo, a reboxetina diminuiu a locomoção dos animais no teste de campo aberto (dados não mostrados). Assim, o efeito antidepressivo da reboxetina não pode ser atribuído a uma ação psicoestimulante deste composto, uma vez que a reboxetina administrada oralmente em uma dose que produziu uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no TSC (20 mg/kg, p.o.) diminuiu a atividade locomotora no teste de campo aberto.

O efeito sinérgico antidepressivo de creatina com os antidepressivos tricíclicos amitriptilina e imipramina, e com o ISRN, reboxetina, foram mostrados neste estudo. O efeito da administração concomitante de reboxetina e creatina no TSC é similar ao efeito sinérgico provocado pela administração combinada de reboxetina e metirapona no TNF (ROGOZ, 2009). Além disso, o potenciador dos efeitos antidepressivo, lítio, também deve ser considerado como uma estratégia no tratamento de pacientes resistentes ao tratamento com reboxetina (KHAZAAL *et al.*, 2005). Além disso, a creatina bloqueou a redução do número de cruzamentos induzida pela administração de reboxetina no teste de campo aberto (dados não mostrados). Ainda, a potenciação do efeito anti-imobilidade da reboxetina pelo tratamento com creatina no TSC foi abolida pela administração de prazosina (dados não mostrados), implicando a ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico no efeito sinérgico da creatina e reboxetina no TSC.

## 5.5. PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA

Camundongos fêmeas foram pré-tratados com creatina (10 mg/kg, p.o.) ou veículos 45 minutos antes do tratamento NMDA (Figura 32A, 0,1 pmol/sítio, i.c.v.) ou com D-serina (Figura 32B, 30 µg/sítio, i.c.v., coagonista de receptores NMDA) ou com seus respectivos veículos. O TSC ou o teste do campo aberto foi realizado quinze minutos depois da administração dos moduladores dos receptores glutamatérgicos NMDA. O tratamento com NMDA foi capaz de bloquear o efeito tipo antidepressivo da administração de creatina no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com creatina ( $F(1,30) = 5,82, p < 0,01$ ), NMDA ( $F(1,30) = 8,38, p < 0,01$ ) e para a interação creatina x NMDA ( $F(1,30) = 15,85, p < 0,01$ ). A administração de NMDA sozinho ou em combinação com creatina não afetou a locomoção no teste do campo aberto ( $p > 0,05$ ).

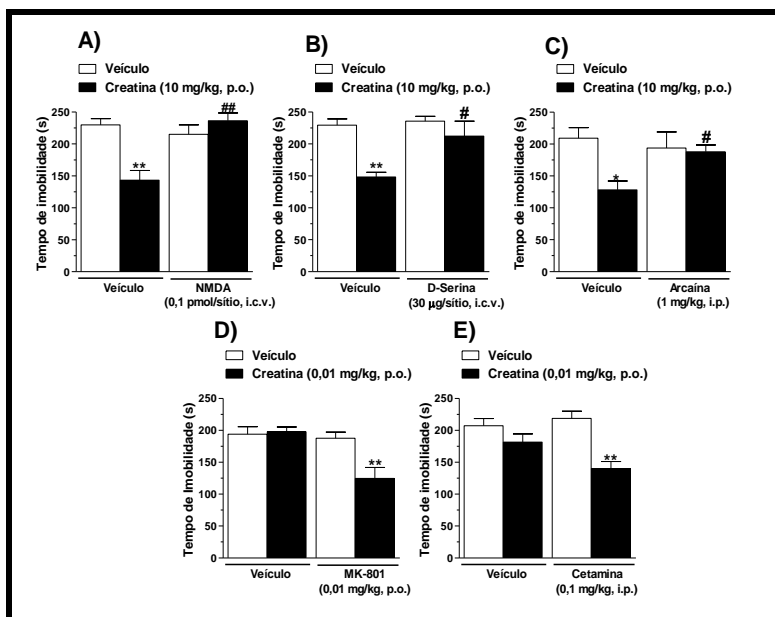
Além disso, a Figura 32B mostra que o tratamento de camundongos com D-serina (30 µg/sítio, i.c.v.) aboliu o efeito antidepressivo de creatina (10 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,33) = 11,92, p < 0,01$ ), D-serina ( $F(1,33) = 5,19, p < 0,05$ ) e para a interação creatina x D-serina ( $F(1,33) = 4,65, p < 0,05$ ). A administração de D-serina sozinha ou em combinação com creatina não afetou a locomoção no teste do campo aberto ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

Ainda, com o intuito de verificar a participação dos sítios das poliaminas no receptor glutamatérgico NMDA no efeito tipo-antidepressivo da creatina, os animais foram pré-tratados com arcaína (Figura 32C, 1 mg/kg, i.p., antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA). A administração de arcaína (1 mg/kg, i.p.) reverteu o efeito antidepressivo de creatina no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,26) = 6,27, p < 0,05$ ) e para a interação arcaína x creatina ( $F(1,33) = 4,69, p < 0,05$ ), mas não para o tratamento com arcaína ( $F(1,33) = 1,63, p = 0,21$ ). A administração de arcaína sozinha ou em combinação com creatina não afetou a locomoção no teste do campo aberto ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

Em outro experimento, os animais receberam uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo e imediatamente após foram administrados com MK-801 (Figura 32D, 0,01 mg/kg,

p.o., antagonista não competitivo de receptores NMDA, dose sub-efetiva) ou o respectivo veículo. Os animais foram submetidos ao TSC ou ao teste do campo aberto 60 minutos após o co-tratamento. A coadministração de MK-801 com creatina reduziu o tempo de imobilidade do TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,32) = 4,822, p < 0,01$ ), MK-801 ( $F(1,32) = 8,684, p < 0,01$ ) e para a interação creatina x MK-801 ( $F(1,32) = 6,075, p < 0,01$ ). A administração de creatina isoladamente ou em combinação com MK-801 não afetou a locomoção no campo aberto ( $P > 0,05$ , dados não mostrados).

Além disso, camundongos foram pré-tratados com creatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo 30 minutos antes do tratamento com cetamina (Figura 32E, 0,1 mg/kg, i.p.) ou com seu respectivo veículo. O TSC ou o teste do campo aberto foi realizado trinta minutos depois da administração de cetamina. A administração combinada de cetamina e creatina produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento de creatina ( $F(1,33) = 18,40, p < 0,01$ ) e para a interação creatina x cetamina ( $F(1,33) = 4,81, p < 0,05$ ), mas não para o tratamento com cetamina ( $F(1,33) = 1,56, p = 0,22$ ). Este resultado não pode ser atribuído a alterações locomotoras, pois nenhuma intervenção farmacológica alterou significativamente a ambulação dos animais no teste do campo aberto ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).



**Figura 32. Envolvimento dos receptores NMDA no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento com NMDA (0,1 pmol/sítio, Painel A), ou D-Serina (30 µg/sítio, co-agonista do receptor glutamatérgico NMDA, Painel B), ou arcaína (antagonista do sítio das poliaminas no receptor glutamatérgico NMDA, Painel C) no efeito tipo antidepressivo da creatina (10 mg/kg, p.o.) e o efeito da combinação de creatina em dose sub-efetiva (0,01 mg/kg, p.o.) e MK-801 (0,01 mg/kg, p.o., antagonista de receptores NMDA, Painel D), ou cetamina (0,1 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores NMDA, Painel E) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle tratado com veículo. #P<0,05, ##P<0,01 comparado com o grupo veículo/creatina.

### 5.5.1. Discussão

Estudos *in vivo* e *in vitro* reportam um papel protetor da creatina contra a morte celular induzida por glutamato e NMDA (BREWER e WALLIMANN, 2000; MALCON, KADDURAH-DAOUK e BEAL, 2000; JURAVLEVA *et al.*, 2005), mas não contra cainato (MIKATI *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstram que o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC provavelmente envolve uma direta ou indireta inibição dos receptores NMDA, uma vez que o tratamento com NMDA, D-Serina (um potente agonista do sítio da glicina do receptor NMDA) ou arcaína (um antagonista do sítio das poliaminas dos receptores NMDA) causaram uma completa reversão do efeito tipo-antidepressivo da creatina. Estudos prévios demonstraram que os efeitos de uma variedade de compostos com propriedades antidepressivas foram prevenidos pelo pré-tratamento de camundongos com NMDA e D-Serina (BROCARD PDE *et al.*, 2008; POLESZAK *et al.*, 2008; ZOMKOWSKI *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2011; ZENI *et al.*, 2011; LUDKA *et al.*, 2013). Creatina em uma dose de 10 mM, mas não 1 mM, reduziu a hiperexcitabilidade neuronal em fatias hipocâmpais sujeitas a anoxia ou fatias controle (PARODI *et al.*, 2003). Por outro lado, a creatina em uma dose de 1 mM aumentou o *binding* de [<sup>3</sup>H] MK-801 em membranas hipocâmpais de ratos, suportando um papel modulatório para este composto tipo-guanidina em baixas concentrações em promover a ativação de receptores NMDA (ROYES *et al.*, 2008). Além disso, um estudo sugere que creatina pode agir como agonista do sítio de poliaminas dos receptores NMDA, desde que a poliamina espermidina intensificou, enquanto arcaína (antagonista dos sítios das poliaminas do receptor NMDA) bloqueou a melhora na memória espacial induzida pela creatina (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Uma possibilidade para explicar este conjunto de resultados é que creatina possa estar agindo como um agonista inverso do sítio das poliaminas dos receptores NMDA.

Além disso, os nossos resultados estão em acordo com estudos que revelaram que a creatina apresenta uma ação inibitória direta sobre a resposta de cálcio mediada por receptores NMDA (GENIUS *et al.*, 2012). Digno de nota, a suplementação com creatina é capaz de atenuar o aumento de glutamato em camundongos transgênicos com fenótipo para a esclerose amiotrófica lateral (ANDREASSEN *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento com creatina reduziu os níveis de glutamato em pacientes

com doença de Huntington (BENDER *et al.*, 2005). Os resultados em nosso estudo indicaram que creatina em uma dose sub-efetiva exerceu um efeito sinérgico anti-imobilidade quando associada com uma dose sub-efetiva de MK-801 ou cetamina no TSC, suportando a hipótese que o efeito antidepressivo da creatina no TSC é dependente de uma inibição dos receptores NMDA. Considerando que inicialmente demonstramos o envolvimento dos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC e tendo em vista que o agonista de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, SKF38393, pode potenciar o efeito tipo-antidepressivo do MK-801, um antagonista não competitivo de receptores glutamatérgico NMDA (YUAN *et al.*, 2011), sugerimos que uma interação de NMDA e receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> pode contribuir para o efeito tipo-antidepressivo da creatina. Em concordância com os nossos dados, estudos prévios do nosso grupo demonstram que MK-801 ou cetamina exercem um efeito anti-imobilidade sinérgico quando associados com uma dose sub-efetiva de compostos com propriedades antidepressivas (MANTOVANI *et al.*, 2003; ZOMKOWSKI *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2011; ZENI *et al.*, 2011; LUDKA *et al.*, 2013). Ainda, a incubação com uma combinação de creatina e MK-801 promoveu uma completa proteção contra um modelo experimental de anoxia em fatias hipocámpais (CARTER *et al.*, 1995).



## 5.6. ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA/ON NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA

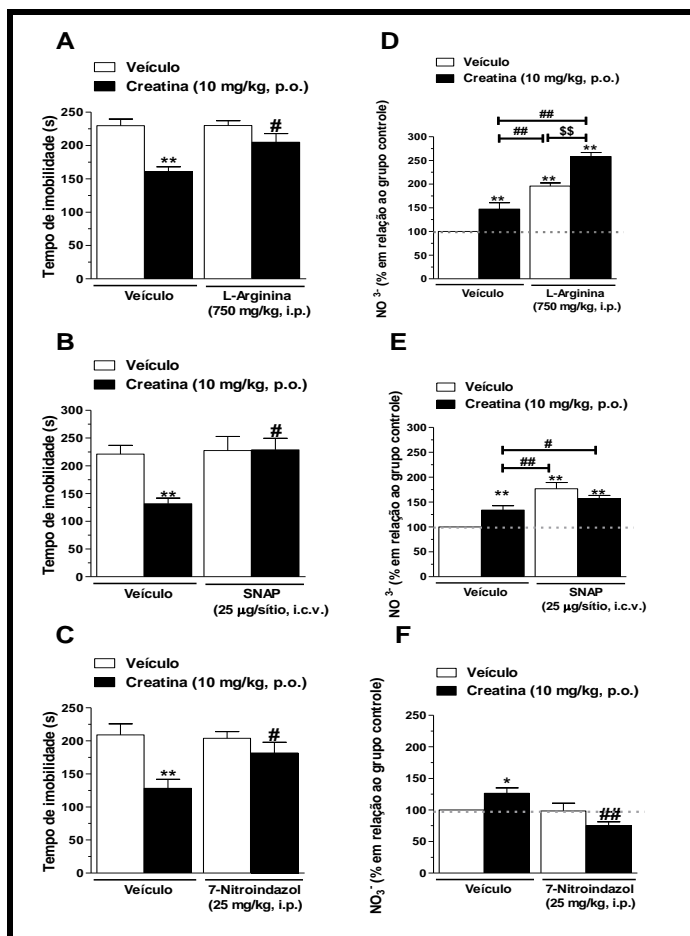
Animais foram administrados com creatina em sua dose efetiva e sessenta minutos depois os mesmos foram decapitados e os cérebros foram dissecados. Após, o hipocampo e o córtex cerebral foram removidos para a determinação dos níveis de NOx (nitrito e nitrato, derivados do ON). Creatina (10 mg/kg, p.o.) aumentou a concentração de NOx no córtex cerebral e no hipocampo de camundongos. O teste T revelou um efeito significativo do tratamento de creatina ( $t(14) = -2,24, p < 0,05$ ). Além disso, a creatina (10 mg/kg, p.o.) aumentou significativamente os níveis de NOx no hipocampo de camundongos (28,3%), quando comparado com o grupo de controle (dados não mostrados). O teste T revelou um efeito significativo do tratamento com creatina ( $t(14) = -2,95, P < 0,01$ ).

Além disso, realizamos um tratamento com creatina e trinta minutos depois os animais foram administrados com L-arginina (um precursor de ON, 750 mg/kg, i.p.). Decorridos trinta minutos os animais foram submetidos ao TSC ou teste do campo aberto ou foram decapitados para a determinação dos níveis de NOx. Os resultados mostram que a administração de L-arginina reverteu completamente o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC (Figura 33A). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com creatina ( $F(1,23) = 23,48, p < 0,01$ ), L-arginina ( $F(1,23) = 5,17, p < 0,05$ ) e para a interação creatina x L-arginina ( $F(1,23) = 5,11, p < 0,05$ ). O tratamento com creatina e/ou L-arginina não alterou a locomoção no teste do campo aberto (dados não mostrados). Além disso, a creatina aumentou os níveis de NOx e L-arginina potencializou este aumento induzido por creatina (Figura 33B). A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento com creatina ( $F(1,16) = 32,92, p < 0,01$ ) e para o tratamento com L-arginina ( $F(1,16) = 116,54, p < 0,01$ ), mas não para a interação creatina x L-arginina ( $F(1,16) = 0,64, p = 0,44$ ).

Ainda, tratamos camundongos com creatina ou veículo e quarenta e cinco minutos depois os animais foram administrados com SNAP (um doador de ON, 25 µg/sítio, i.c.v.) e quinze minutos após os animais foram submetidos ao TSC ou teste do campo aberto ou foram decapitados para as análises de NOx. Os resultados demonstram que a administração de SNAP bloqueou o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC (Figura 33C). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com creatina

( $F(1,24) = 5,47$ ,  $p < 0,05$ ), SNAP ( $F(1,24) = 7,60$ ,  $p < 0,05$ ), e para a interação creatina x SNAP ( $F(1,24) = 5,81$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, os aumentos nos níveis de NOx induzidos por creatina foram potenciados pela administração com SNAP (Figura 33D). A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o tratamento com SNAP ( $F(1,21) = 43,51$ ,  $p < 0,01$ ) e para a interação creatina x SNAP ( $F(1,21) = 12,64$ ,  $p < 0,01$ ), mas não para o tratamento com creatina ( $F(1,21) = 0,86$ ,  $p = 0,37$ ).

Em outro experimento, os camundongos receberam creatina (10 mg/kg, p.o.) e após trinta minutos foram administrados com 7-nitroindazol (um inibidor da enzima NOS neuronal, 25 mg/kg, i.p.). Decorridos trinta minutos após os animais foram submetidos ao TSC ou teste do campo aberto ou foram decapitados para as análises de NOx. Os resultados demonstram que a administração de 7-nitroindazol bloqueou o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC (Figura 33E). A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o tratamento com creatina ( $F(1,26) = 10,67$ ,  $p < 0,01$ ) e para a interação 7-nitroindazol x creatina ( $F(1,26) = 5,62$ ,  $p < 0,05$ ), mas não para o tratamento com 7-nitroindazol ( $F(1,26) = 4,09$ ,  $p = 0,05$ ). Além disso, os aumentos nos níveis de NOx induzidos por creatina foram completamente revertidos pela administração de 7-nitroindazol (Figura 33F). A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento com creatina ( $F(1,28) = 9,65$ ,  $p < 0,01$ ) e para a interação creatina x 7-nitroindazol ( $F(1,28) = 8,48$ ,  $p < 0,01$ ), mas não para o tratamento com 7-nitroindazol ( $F(1,28) = 0,04$ ,  $p = 0,84$ ).



**Figura 33. Envolvimento da via L-arginina/ON no efeito tipo antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento com L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursor de ON), ou SNAP (30 µg/sítio, doador de ON), ou 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p., inibidor da enzima NOS neuronal) no efeito tipo antidepressivo da creatina (10 mg/kg, p.o.) no TSC (Painéis A, B e C, respectivamente) e nos níveis de NOx no córtex cerebral de camundongos (Painéis D, E e F, respectivamente). Cada coluna representa Média + E.P.M. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle tratado com veículo. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$  comparado com o grupo veículo/creatina. \$\$\$ $P < 0,01$  comparado com o grupo administrado com veículo/L-arginina.

### 5.6.1. Discussão

O ON é produzido por diferentes tipos de células em organismos multicelulares, nos quais age como um mensageiro difusível em processos de comunicação celular e sinalização intracelular (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1989; BREDT e SNYDER, 1992; NATHAN, 1992; KERWIN, LANCASTER e FELDMAN, 1995; CONTESTABILE, 2000; CONTESTABILE *et al.*, 2003). Uma grande quantidade de ON é neurotóxica, enquanto pequenas concentrações são neuroprotetoras (CALABRESE *et al.*, 2007). O ON controla processos de proliferação e diferenciação em células progenitoras neuronais (CHENG *et al.*, 2003). Entretanto, o excesso de ON também leva a processos de morte celular neuronal em condições neurotóxicas (MELDRUM e GARTHWAITE, 1990; BARANANO e SNYDER, 2001). Um estudo indicou que a administração de L-arginina, em baixas concentrações, produziu efeito tipo-antidepressivo, e, em altas doses, este efeito é perdido, sugerindo que ON apresenta um papel dual na modulação da depressão (DA SILVA *et al.*, 2000; INAN, YALCIN e AKSU, 2004; SPIACCI *et al.*, 2008). No presente estudo, creatina na dose de 10 mg/kg aumentou os níveis de NOx no hipocampo (dados não mostrados) e córtex cerebral de camundongos. Este efeito pode ser atribuído a uma específica modulação da atividade das isoformas da enzima NOS pela creatina. Entretanto, os detalhes do mecanismo em que a creatina modula os níveis de ON não estão elucidados. Uma possibilidade é que a creatina possa modular o tônus serotoninérgico via ON, desde que altas concentrações de doadores de ON, como o SNAP, aumenta a liberação de 5-HT, e baixas concentrações de doadores de ON diminuem a liberação deste neurotransmissor (KAEHLER *et al.*, 1999). Os resultados aqui apresentados sugerem que o aumento na síntese de ON e o subsequente efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC pode ser dependente ao menos em parte de uma modulação serotoninérgica.

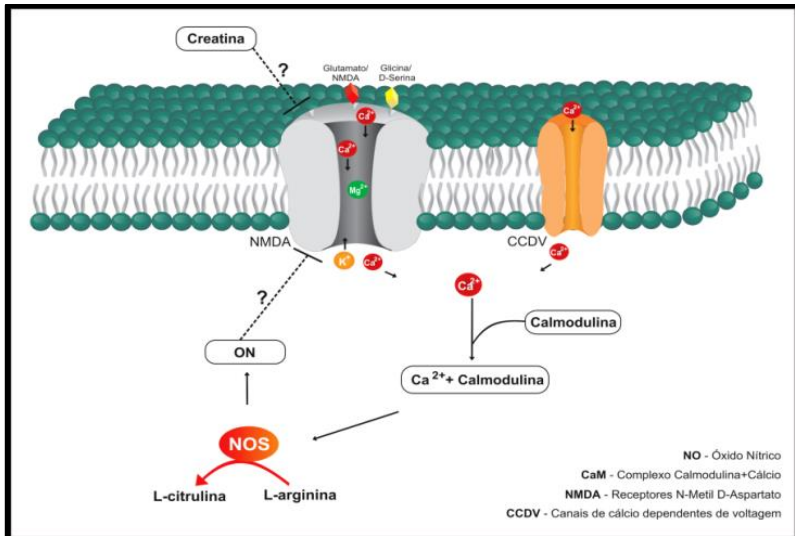
Um estudo demonstrou que a suplementação com creatina produziu uma significativa diminuição nos níveis de ON (33%) e resultou em um completo reestabelecimento dos níveis de ON em *Drosophila melanogaster* tratada com a neurotoxina dopaminérgica rotenona (HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010). Contrariamente, um estudo *in vitro* demonstrou que a incubação com creatina aumenta o número de células positivas para NOS neuronal (DUCRAY *et al.*, 2006). Além disso, um estudo demonstrou que creatina bloqueou o aumento de ON induzido por glutamato e

reverteu a diminuição dos níveis de ON induzida pela administração de haloperidol em células mistas de neurônios e astrócitos (JURAVLEVA *et al.*, 2003). Desta forma, a literatura sugere um papel dual da creatina sobre a síntese de óxido nítrico. Digno de nota, em nosso estudo o antagonista de receptores NMDA cetamina também aumentou os níveis de NOx no córtex cerebral e no hipocampo, sugerindo que a modulação dos níveis de ON seja um importante alvo de antidepressivos miméticos à cetamina. Em concordância com os nossos resultados, um estudo demonstrou que cetamina administrada periféricamente ou centralmente aumentou os níveis de NOx no hipocampo e no estriado de ratos (WU *et al.*, 2000).

Considerando o possível papel da creatina na modulação dos níveis de ON, este estudo também investigou a participação da via L-arginina/ON no seu efeito tipo-antidepressivo no TSC. Mostramos evidências de que a modulação dos níveis de ON está implicada no efeito anti-imobilidade da creatina no TSC, visto que o tratamento de animais com L-arginina ou com SNAP causou uma completa reversão do efeito tipo-antidepressivo da creatina. Nosso grupo previamente demonstrou que os efeitos de uma variedade de compostos com propriedades antidepressiva foram prevenido pelo tratamento com L-arginina ou SNAP (DA SILVA *et al.*, 2000; ALMEIDA, R. C. *et al.*, 2006; BROCARD PDE *et al.*, 2008; ZOMKOWSKI *et al.*, 2010; MORETTI *et al.*, 2011; LUDKA *et al.*, 2013). Além disso, KRASS *et al.* (2011) recentemente mostrou que o pré-tratamento com L-arginina reverteu o efeito tipo-antidepressivo de diversos tipos de antidepressivos, como imipramina, venlafaxina e bupropiona no TNF. No presente estudo, SNAP ou L-arginina potenciaram o efeito da administração de creatina (10 mg/kg) no aumento nos níveis de NOx no córtex cerebral de camundongos, o que pode ter gerado níveis excessivos de ON e perda do efeito tipo-antidepressivo, em concordância com um estudo prévio do nosso grupo que mostrou que a L-arginina produz um efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado em baixas doses (revertido por um inibidor de NOS), mas não em doses elevadas. Desta forma, nossa hipótese é que baixos níveis de ON produzidos pela administração de creatina podem ser efetivos em produzir um efeito tipo-antidepressivo. Consistente com esta hipótese, o tratamento de camundongos com 7-nitroindazol (um específico inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal) bloqueou o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC, bem como

os aumentos nos níveis de NOx no córtex cerebral de camundongos. Ainda, a literatura demonstrou que outro inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal, L-NAME, preveniu o aumento dos níveis de NOx induzidos por cetamina (WU *et al.*, 2000).

Uma possibilidade que pode explicar os nossos resultados é que ON pode inibir a função dos receptores NMDA através de uma direta ação no complexo receptor/canal iônico (LEI *et al.*, 1992; MANZONI *et al.*, 1992). A nitrosilação das subunidades NR1 e NR2 do receptor NMDA resulta em um *downregulation* funcional da atividade do receptor NMDA, protegendo assim os neurônios de insultos neurotóxicos causados pela excessiva ativação deste receptor (HOYT *et al.*, 1992; LEI *et al.*, 1992; FAGNI *et al.*, 1995; LIPTON *et al.*, 1998; CHOI e LIPTON, 2000). Digno de nota, o antagonista de receptores NMDA cetamina também aumentou os níveis de ON no hipocampo e estriado de ratos (WU *et al.*, 2000) e estimulou a via L-arginina/ON via ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (ROMERO *et al.*, 2011). Esses achados também corroboram com os nossos resultados em que a cetamina aumentou os níveis de NOx no córtex cerebral e no hipocampo (resultados não mostrados). Uma hipótese experimental explicando as ações da creatina no receptor NMDA e nos níveis de ON é exemplificada esquematicamente na Figura 34.



**Figura 34. Modelo experimental proposto para o mecanismo de ação envolvido no efeito antidepressivo da creatina, através de uma inativação dos receptores NMDA e aumento dos níveis de ON.** A creatina poderia estar modulando diretamente o receptor NMDA, ou mesmo o aumento dos níveis de ON induzido pela creatina poderia estar promovendo uma nitrosilação das subunidades do receptor NMDA. Esta inativação dos receptores poderia ser um mecanismo importante para o efeito antidepressivo da administração aguda de creatina.

## 5.7. ENVOLVIMENTO DE PKA, CaMK-2, PKC, MEK1/2 NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA NO TSC

O resultado apresentado na Figura 35A mostra que o efeito de anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi impedido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de PKA H-89 (1 µg/sítio, i.c.v.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento de creatina ( $F(1,29) = 8,94$ ,  $p < 0,01$ ) e a interação creatina  $\times$  H-89 ( $F(1,29) = 6,10$ ,  $p < 0,05$ ), mas não para o tratamento com H-89 ( $F(1,29) = 2,39$ ,  $p = 0,13$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com creatina e/ou H-89 ( $P > 0,05$ , dados não mostrados).

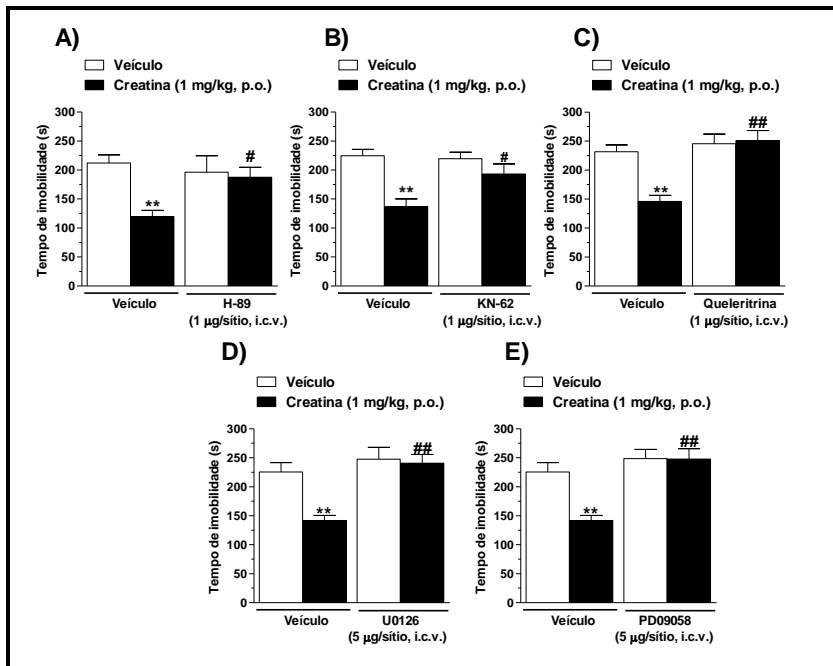
O resultado representado na Figura 35B mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi prevenido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de CaMK-2 KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento de creatina ( $F(1,29) = 15,97$ ,  $p < 0,01$ ) e a interação creatina  $\times$  KN-62 ( $F(1,29) = 4,52$ ,  $p < 0,05$ ), mas não para o tratamento com KN-62 ( $F(1,29) = 3,19$ ,  $p < 0,08$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com creatina e/ou tratamento com KN-62 ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

O resultado mostrado na Figura 35C mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi prevenido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de MEK 1/2 U0126 (5 µg/sítio, i.c.v.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,27) = 8,36$ ,  $p < 0,01$ ), U0126 ( $F(1,27) = 14,74$ ,  $p < 0,01$ ) e a interação creatina  $\times$  U0126 ( $F(1,27) = 5,99$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, o efeito antidepressivo da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi prevenido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de MEK1/2 PD098059 (5 µg/sítio, i.c.v.) no TSC (Figura 35D). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,27) = 8,74$ ,  $p < 0,01$ ), U0126 ( $F(1,27) = 16,79$ ,  $p < 0,01$ ) e a interação entre creatina  $\times$  U0126 ( $F(1,27) = 6,68$ ,  $p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no teste de campo aberto não foi alterado pelo tratamento com creatina e/ou U0126 ou PD098059 ( $P > 0,05$ , dados não mostrados).

O resultado mostrado na Figura 35E mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi prevenido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de PKC queleritrina (1 µg/sítio, i.c.v.) no TST. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças



significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,31) = 7,87$ ,  $p < 0,01$ ), queleritrina ( $F(1,31) = 17,29$ ,  $p < 0,01$ ) e creatina  $\times$  queleritrina ( $F(1,31) = 10,15$ ,  $p < 0,01$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com creatina e/ou queleritrina ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).



**Figura 35. Envolvimento de PKA, CaMK-2, MEK/ERK 1/2, e PKC no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento de camundongos com H-89 (1 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de PKA, Painei A), ou KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de CaMK-2, Painei B), ou PD09058 (5 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de MEK 1/2, Painei C), ou U0126 (5 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de MEK 1/2, Painei C), ou quelerritrina (1 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de PKC, Painei C), no efeito tipo antidepressivo da creatina (1 mg/kg, p.o.) no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle tratado com veículo. # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , comparado com o grupo veículo/creatina.

### 5.7.1. Discussão

Demonstramos que a creatina produz seu efeito antidepressivo no TSC, ativando vias de sinalização intracelular mediada por PKA, PKC, CaMK-2 e MEK/ERK 1/2.

A PKA é conhecida por estar associada com a patogênese e tratamento da depressão (OZAWA e RASENICK, 1991). Este estudo mostra que a redução no tempo de imobilidade no TSC induzida pelo tratamento com creatina foi completamente abolida pelo pré-tratamento dos camundongos com o H-89, um isoquinolinesulfonamida que atua como um inibidor competitivo no sítio do ATP da subunidade catalítica de PKA. O inibidor de PKA H-89 também aboliu o efeito antidepressivo da fluoxetina e da eletroacupuntura (duas estratégias amplamente utilizadas no tratamento da depressão), em camundongos estressados (LIU *et al.*, 2012). Além disso, H-89 também reverteu o efeito antidepressivo do ácido ferúlico e da memantina (ALMEIDA, R. C. *et al.*, 2006; ZENI *et al.*, 2012). Contudo, um estudo demonstrou que H-89 não alterou o efeito facilitador da memória espacial da creatina no teste do labirinto Barnes (SOUZA *et al.*, 2012). Isto pode ser devido à diferença nos paradigmas comportamentais empregue no presente estudo que investigou o perfil antidepressivo da creatina em comparação com ao utilizado no estudo da literatura que investigou o efeito facilitador da creatina na retenção de aprendizagem espacial.

A CaMK-2 é a proteína cinase mais abundante no cérebro e é ativada por um tratamento a longo prazo com algumas drogas antidepressivas, sugerindo que a modulação de CaMK-2 pode também ter importantes efeitos benéficos no tratamento de transtornos depressivos (D'SA e DUMAN, 2002). O presente estudo demonstra que CaMK-2 desempenha um papel na mediação do efeito antidepressivo provocada pelo tratamento agudo com creatina no TSC, porque KN-62, um inibidor que interage com o domínio de regulação de CaMK-2 e bloqueia a forma ativa desta enzima, foi capaz de abolir completamente o efeito antidepressivo da creatina no TSC. Além disso, KN-62 também reverteu o efeito antidepressivo do ácido ferúlico e da memantina (ALMEIDA, R. C. *et al.*, 2006; ZENI *et al.*, 2012). Os nossos resultados estão de acordo com um estudo neuroquímico que revelou que o tratamento com creatina em ratos aumentou os níveis de pCAMK-2 (SOUZA *et al.*, 2012). Além disso, KN-62 suprime o aumento da retenção de aprendizagem

especial induzido pela creatina, sugerindo que CaMK-2 pode também ter um papel crucial na mediação dos efeitos cognitivos da creatina (SOUZA *et al.*, 2012).

Outra proteína cinase implicada na fisiopatologia da depressão é a PKC, cuja atividade foi relatada estar diminuída no córtex pré-frontal e hipocampo de adolescentes suicidas, e em modelos animais de depressão (ABRIAL *et al.*, 2011). Curiosamente, a administração aguda do ativador da PKC, briostatina-1, em camundongos resultou em uma atividade antidepressiva, a qual foi suprimida pela administração de um inibidor de PKC (SUN e ALKON, 2005). Os nossos dados demonstraram que o efeito antidepressivo da creatina foi também impedido pelo pré-tratamento com queleritrina, um alcalóide de benzofenantridina, que é um inibidor seletivo e competitivo potente do sítio de ligação do ATP no domínio catalítico da PKC, o que sugere que esta via de sinalização está envolvida na ação antidepressiva da creatina no TSC. Queleritrina também reverteu o efeito antidepressivo do ácido ferúlico no TSC (ZENI *et al.*, 2012).

Existem relatos mostrando que a fluoxetina, um ISRS, promove uma rápida ativação da cascata MAPK em cultivo primário de astrócitos (NEVE, SEAMANS e TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). Em nosso estudo, demonstramos o envolvimento da via MEK/ERK no efeito antidepressivo agudo da creatina no TSC. O pré-tratamento dos camundongos com os inibidores de MEK 1/2, PD098059 e U0126, em doses que não tiveram nenhum efeito sobre o TSC inibiu significativamente o efeito anti-imobilidade da creatina. Os inibidores de MEK empregados neste estudo apresentam diferenças nos mecanismos de ação. PD098059 inibe a ativação de MEK1 e MEK2 por ligação na enzima inativa, o que impede a sua ativação por Raf cinase e, subsequentemente, inibe a ativação de ERK1/2 (DUDLEY *et al.*, 1995). U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis [2-aminofeniltio] butadieno) é um inibidor seletivo e potente da atividade de MEK1, *in vitro*, bem como da ativação de ERK1/2 por MEK1/2 diretamente *in vivo* por inibição da atividade catalítica da enzima ativa (FAVATA *et al.*, 1998). Assim, U0126 tem seu mecanismo de ação em um passo anterior ao de PD098059 na atividade de MEK1/2. Os nossos resultados indicam que o efeito do tipo antidepressivo da administração aguda de creatina pode ser devido a uma ativação da via de MEK/ERK. Reforçando nossos resultados foi verificado que U0126 e PD09059 também reverteram à ação antidepressiva de outros compostos

dotados de tal propriedade, como a memantina e o ácido ferúlico (ALMEIDA, R. C. *et al.*, 2006; ZENI *et al.*, 2012). Reforçando esta hipótese, um estudo de DELDICQUE *et al.* (2007), também demonstrou que o tratamento com creatina aumenta a atividade de ERK 1/2 em células C2C12.

Em experimentos anteriores, demonstramos que o efeito antidepressivo da creatina é dependente da ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Curiosamente, o agonista seletivo de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos fenilefrina induziu a um aumento dos níveis de ERK 1/2 fosforilada, e U0126 bloqueou este efeito (BAUER *et al.*, 2011). Isto sugere que a ativação do receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico induzida pela creatina pode desempenhar um papel na fosforilação de ERK 1/2.

Também demonstramos que o efeito antidepressivo da creatina é dependente da ativação dos receptores de dopamina  $D_1$  e  $D_2$ . A estimulação do receptor dopaminérgico  $D_1$  ativa uma via de sinalização intracelular mediada por PKC e PKA (NEVE, SEAMANS e TRANTHAM-DAVIDSON, 2004). Além disso, os receptores dopaminérgicos  $D_2$  ativam os alvos intracelulares de PKC, MEK/ERK 1/2 e CaMK-2 (YAN *et al.*, 1999). Sugere-se que a ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular mediadas por PKA, PKC, CaMK-2 e de ERK 1/2 e a sua influência sobre o efeito antidepressivo da creatina pode ser dependente da ativação dos receptores dopaminérgicos  $D_1$  e  $D_2$ .

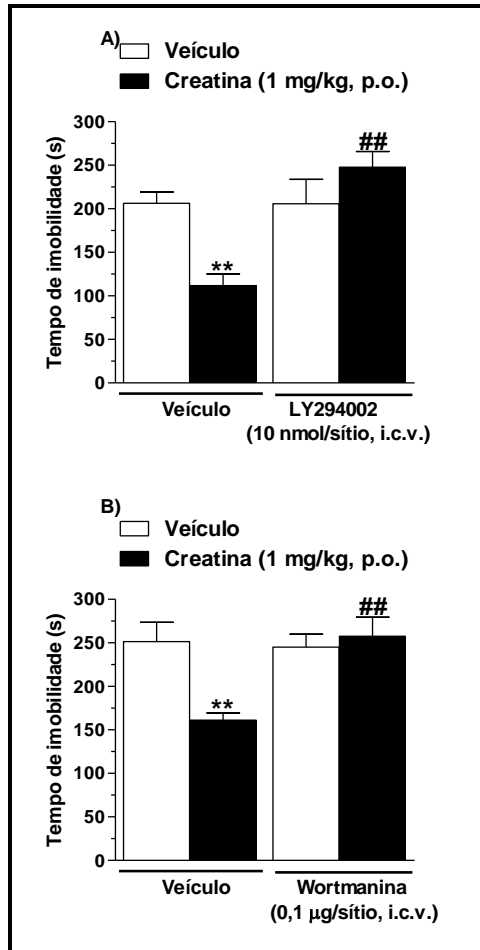
A reversão do efeito antidepressivo da creatina no TSC na presença de inibidores das vias de sinalização intracelular não é devido a qualquer alteração na atividade locomotora, visto que a administração de H-89, KN-62, queleritrina, U0126 e PD098059 sozinhos ou em combinação com creatina não alterou significativamente a atividade locomotora de camundongos.

Os resultados deste estudo fornecem dados claros sobre a participação da PKA, CaMK-2, PKC e MEK / ERK no efeito antidepressivo da creatina, reforçando a noção de que estes são alvos importantes para a atividade antidepressiva. Além disso, os nossos resultados também reforçam os dados da literatura que demonstraram o TSC como um instrumento útil para a avaliação de alvos intracelulares envolvidos nos efeitos comportamentais de compostos antidepressivos.

## 5.8. ENVOLVIMENTO DA PI3K/AKT NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CREATINA

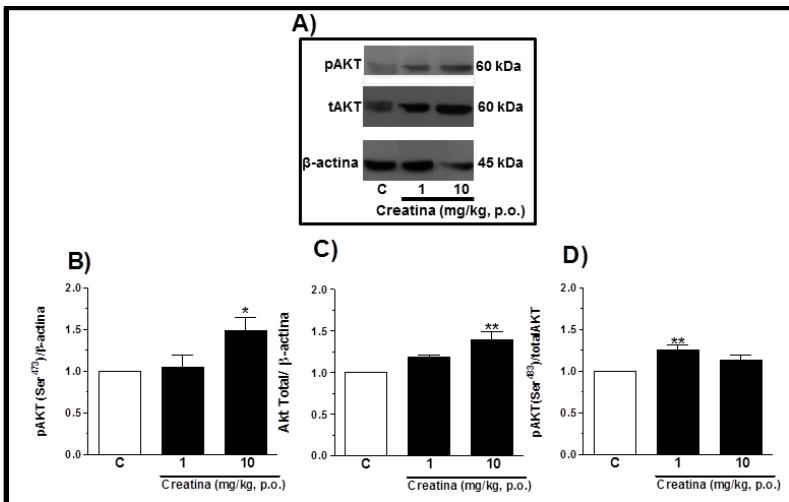
O resultado representado na Figura 36A mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi prevenido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de PI3K LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento de creatina ( $F(1,27) = 29,17$ ,  $p < 0,01$ ), LY294002 ( $F(1,27) = 19,44$ ,  $p < 0,01$ ), e da interação creatina  $\times$  LY294002 ( $F(1,27) = 4,52$ ,  $p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no teste de campo aberto não foi alterado pelo tratamento com creatina (1 mg/kg, p.o.) e/ou LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v.) ( $p > 0,05$ ).

Além disso, o resultado ilustrado na Figura 36B mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi prevenido pelo tratamento dos camundongos com o inibidor de PI3K wortmanina (0,1  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,27) = 29,17$ ,  $p < 0,01$ ), wortmanina ( $F(1,27) = 19,44$ ,  $p < 0,01$ ), e para a interação entre creatina  $\times$  wortmanina ( $F(1,27) = 4,52$ ,  $p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com creatina (1 mg/kg, p.o.) e/ou wortmanina (0,1  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).



**Figura 36. Envolvimento de PI3K no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento de camundongos com LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v., um inibidor de PI3K, Painei A), ou wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de PI3K, Painei B) no efeito tipo antidepressivo da creatina (1 mg/kg, p.o.) no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle tratado com veículo. ##P<0,01 comparado com o grupo veículo/creatina.

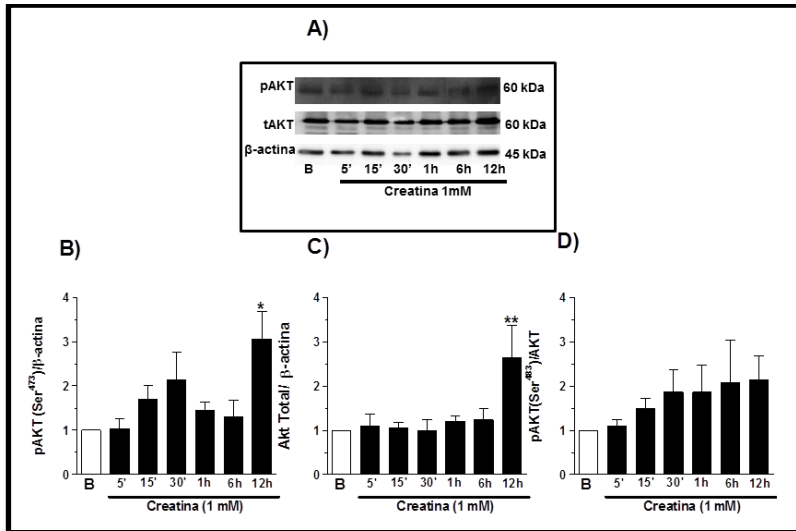
Ainda o presente estudo observou que a administração de creatina (1 mg/kg, p.o.), aumentou a relação pAKT/AKT total no hipocampo de camundongos, quando comparado com o grupo controle (Figura 37D). A ANOVA revelou um efeito significativo do tratamento com creatina em camundongos ( $F(2,11) = 8,77$ ,  $p < 0,01$ ). Além disso, a creatina (10 mg/kg, p.o.) aumentou a expressão de pAKT e AKT no hipocampo de camundongos (Figura 37B-C, respectivamente): ANOVA de uma via ( $F(2,15) = 5,07$ ,  $p < 0,01$ ) e ( $F(2,13) = 8,71$ ,  $p < 0,01$ ), respectivamente.



**Figura 37. Creatina aumenta a fosforilação de AKT em hipocampo de camundongos.** Efeito do tratamento de camundongos com creatina (1-10 mg/kg, p.o.) sobre a fosforilação de AKT. Cada coluna representa Média + EPM. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle incubado com veículo.



A creatina, incubada por 12 horas, aumentou a expressão de pAKT e AKT total em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 38B e 37C, respectivamente), tal como revelado por ANOVA de uma via ( $F(7,41) = 4,00$ ,  $p < 0,01$ ) e ( $F(7,39) = 2,79$ ,  $p < 0,05$ ), respectivamente. A creatina, incubada por 12 horas, não alterou a razão de pAKT/AKT em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 38D,  $p > 0,05$ ).



**Figura 38. Creatina aumenta os níveis e a fosforilação de AKT em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** Efeito da incubação de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y com creatina (1mM) por diferentes períodos de tempo sobre a fosforilação de AKT. Cada coluna representa Média + EPM. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo controle incubado com veículo.

Ainda, ARA014418 (um inibidor de GSK3 $\beta$ ) administrado em uma dose sub-efetiva (0,01  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) exibiu um potente efeito antidepressivo sinérgico, quando combinado com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) no TSC (36,64% de redução no tempo de imobilidade em comparação com o grupo controle) (Figura 39A). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,27) = 12,347, p < 0,01$ ), ARA014418 ( $F(1,27) = 6,252, p < 0,05$ ), e para a interação creatina  $\times$  ARA014418 ( $F(1,27) = 4,952, p < 0,05$ ). Além disso, o número de cruzamentos no TCA não foi alterado pela administração de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) e/ou ARA014418 (0,01  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

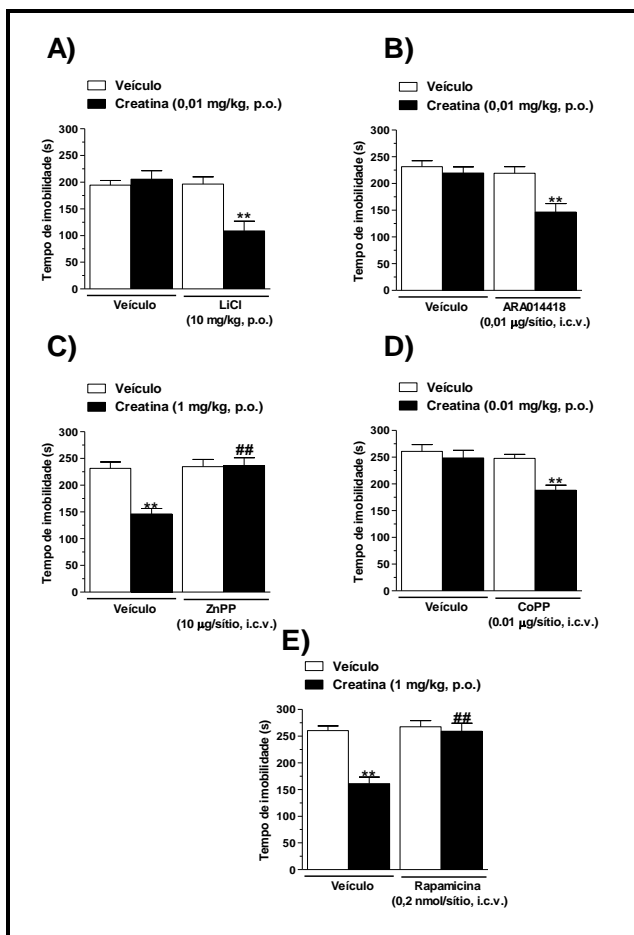
Além disso, o cloreto de lítio (um inibidor GSK3 $\beta$ ) administrado em uma dose sub-efetiva (10 mg/kg, p.o.) exibiu um potente efeito antidepressivo sinérgico, quando combinado com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) em camundongos submetidos ao TSC (44,19% de redução no tempo de imobilidade), em comparação com o grupo controle (Figura 39B). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,25) = 6,26, p < 0,01$ ), cloreto de lítio ( $F(1,25) = 9,53, p < 0,01$ ), e para a interação creatina  $\times$  cloreto de lítio ( $F(1,25) = 10,34, p < 0,01$ ). Além disso, o número de cruzamentos não foi alterado pela administração de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) e/ou cloreto de lítio (10 mg/kg, p.o.) ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

O resultado representado na Figura 39C mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina (1 mg/kg, p.o.) foi bloqueado pelo tratamento dos camundongos com o seletivo inibidor de HO-1, Zn (II) PPIX (10  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,27) = 29,17, p < 0,01$ ), Zn (II) PPIX ( $F(1,27) = 19,44, p < 0,01$ ), e para a interação creatina  $\times$  Zn (II) PPIX ( $F(1,27) = 4,52, p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterado pelo tratamento com creatina (1 mg/kg, p.o.) e/ou Zn (II) PPIX (10  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

CoPPIX administrado em uma dose de sub-efetiva (0,01  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) exibiu um potente efeito antidepressivo sinérgico, quando combinado com uma dose sub-efetiva de creatina (0,01 mg/kg, p.o.) no TSC (27,80% de redução no tempo de imobilidade, em comparação com o grupo controle) (Figura 39D). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,28) = 9,76, p < 0,01$ ), CoPPIX ( $F(1,28) = 10,10, p$

$<0,01$ ), e para a interação creatina  $\times$  CoPPIX ( $F(1,28) = 4,24$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, o número de cruzamentos não foi alterado pela administração de creatina ( $0,01 \text{ mg / kg, po}$ ) e/ou CoPPIX ( $0,01 \text{ }\mu\text{g/sítio, i.c.v.}$ ) ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).

O resultado representado na Figura 39E mostra que o efeito anti-imobilidade da creatina ( $1 \text{ mg/kg, p.o.}$ ) foi bloqueado pelo tratamento dos camundongos com o inibidor seletivo de mTOR rapamicina ( $0,2 \text{ nmol/sítio, i.c.v.}$ ) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com creatina ( $F(1,27) = 29,17$ ,  $p < 0,01$ ), rapamicina ( $F(1,27) = 19,44$ ,  $p < 0,01$ ) e para a interação creatina  $\times$  rapamicina ( $F(1,27) = 4,52$ ,  $p < 0,05$ ). O número de cruzamentos no TCA não foi alterada pelo tratamento com creatina ( $1 \text{ mg/kg, p.o.}$ ) e/ou rapamicina ( $p > 0,05$ , dados não mostrados).



**Figura 39. Envolvimento de alvos da AKT: GSK-3 $\beta$ , nrf2/HO-1, e mTOR no efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.** Efeito do pré-tratamento de camundongos com protoporfirina de zinco (1 µg/sítio, i.c.v., inibidor da atividade de HO-1, Painei C), ou rapamicina (1 µg/sítio, i.c.v., inibidor de mTOR, Painei E) e o efeito da combinação de creatina em dose sub-efetiva (0,01 mg/kg, p.o.) e LiCl (10 mg/kg, p.o., inibidor de GSK-3 $\beta$ , Painei A), ou ARA014418 (0,01 µg/sítio, i.c.v., inibidor de GSK-3 $\beta$ , Painei B) ou protoporfirina de cobalto (0,01 µg/sítio, i.c.v., um indutor da expressão gênica de HO-1, Painei D) na imobilidade no TSC. Cada coluna representa Média + EPM. \*\*P<0,01 comparado com o grupo controle tratado com veículo. ##P<0,01 comparado com o grupo veículo/creatina.

### 5.8.1. Discussão

Demonstramos em experimentos prévios que o efeito antidepressivo da creatina no TSC pode estar associado com uma ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico. A ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico modula as vias de sinalização intracelular mediadas por PI3K/AKT (STRITTMATTER *et al.*, 2012). No presente estudo, demonstramos que a creatina produziu efeito antidepressivo no TSC e que esse efeito é mediado pela via de sinalização intracelular modulada por PI3K/AKT, GSK3 $\beta$ , mTOR e HO-1.

Um estudo demonstrou uma diminuição na atividade enzimática da PI3K e AKT em vítimas de suicídio deprimidos e sujeitos suicidas não deprimidos (KAREGE *et al.*, 2011). No presente trabalho, demonstramos que LY294002 e wortmanina bloquearam o efeito antidepressivo da creatina. LY294002 é um derivado de morfolina da quercetina e é um inibidor reversível da PI3K (VLAHOS *et al.*, 1994; MAIRA, FURET e STAUFFER, 2009). Wortmanina é um metabólito de um furanoesteróide dos fungos *Talaromyces* (*Penicillium wortmannii*) e é um inibidor covalente específico da PI3K (VLAHOS *et al.*, 1994). Portanto, os estudos do nosso grupo têm relatado que LY294002 e wortmanina impediram o efeito antidepressivo de compostos antidepressivos no TSC (BETTIO *et al.*, 2012; BUDNI *et al.*, 2012; ZENI *et al.*, 2012).

O ISRS fluvoxamina aumentou rapidamente a fosforilação da AKT em células PC12 (NAKANO *et al.*, 2010). Portanto, a fluoxetina aumenta a fosforilação de AKT, evento que está relacionado com a sobrevivência das células neuronais (DAVID *et al.*, 2010). Reforçando estes achados, os nossos resultados demonstraram que a creatina aumenta a fosforilação de AKT no hipocampo de camundongos e nas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Um estudo de DELDICQUE *et al.* (2007) também demonstrou que a creatina aumentou a fosforilação de AKT em células C2C12.

A via PI3K/AKT atua regulando a atividade de GSK3 $\beta$ , uma vez que este sistema pode diretamente fosforilar o resíduo de serina 9 de GSK3 $\beta$ , conduzindo à inativação GSK3 $\beta$  (GRIMES e JOPE, 2001; BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). A GSK3 é uma enzima constitutivamente ativa, encontrada em duas isoformas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) em mamíferos, e é altamente expressa no cérebro, tendo numerosos alvos celulares, incluindo os fatores de transcrição, as proteínas do citoesqueleto, e as moléculas envolvidas em divisão celular. Geralmente, GSK3 $\beta$  ativa é pró-apoptótica e a sua inibição,

por exemplo, por fosforilação através de AKT é anti-apoptótica (GOULD *et al.*, 2004; GOULD, ZARATE e MANJI, 2004). Várias evidências apontam a GSK3 $\beta$  como um alvo de drogas para certos transtornos no cérebro, incluindo a depressão. Dados da literatura relatam que os inibidores GSK3 $\beta$ , incluindo lítio, L803-mts, ARA014418, tiazolidona e NP031115 reduziu a imobilidade no TNF (GOULD *et al.*, 2004; KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram, pela primeira vez ao nosso conhecimento, que o inibidor GSK3 $\beta$  ARA014418 administrado i.c.v. diminuiu o tempo de imobilidade no TSC. Um efeito semelhante foi demonstrado por (GOULD *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008), utilizando a administração por via i.p. de ARA014418. Além disso, no presente estudo, outro inibidor GSK3 $\beta$  clássico, lítio, também produziu efeito antidepressivo no TSC. Estudos relataram que o lítio apresenta propriedades antidepressivas no TST e TNF em diferentes linhagens de camundongos (CAN *et al.*, 2011; BUDNI *et al.*, 2012). Creatina em dose sub-efetiva quando combinada com dose sub-efetiva de ARA014418 ou lítio produz o efeito antidepressivo sinérgico. Por conseguinte, tem sido relatado que ARA014418 exerce um efeito anti-imobilidade sinérgico quando associada com uma dose sub-efetiva de ácido fólico, um composto com propriedades antidepressivas no TSC e TNF (BUDNI *et al.*, 2012).

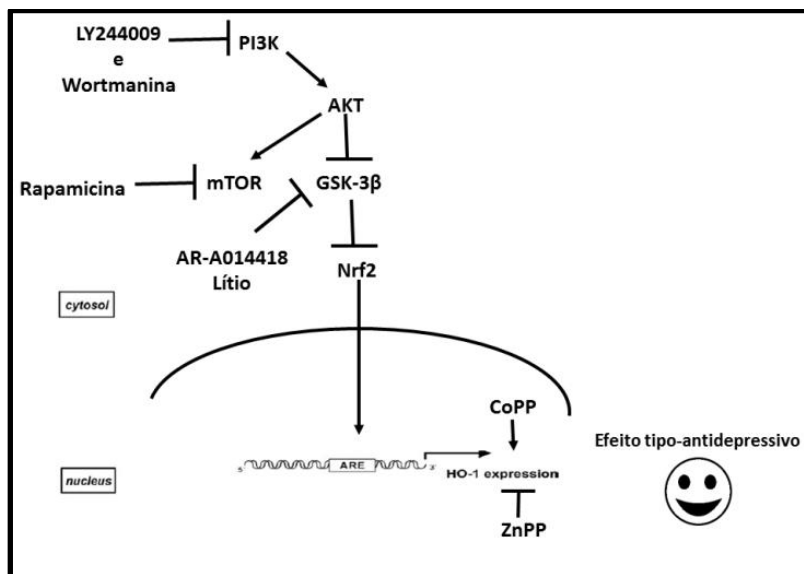
A GSK3 $\beta$  produz exclusão nuclear e inativação de Nrf2 (SALAZAR *et al.*, 2006; ROJO, SAGARRA e CUADRADO, 2008). Nrf2 é um fator de transcrição que se liga a uma região promotora de genes que codificam HO-1 (KATSUOKA *et al.*, 2005; KENSLER, WAKABAYASHI e BISWAL, 2007). Esta enzima cataboliza o grupamento heme livre, ou seja, um catabolismo de protoporfirina (IX) de ferro (Fe) a quantidades equimolares de Fe<sup>2+</sup>, monóxido de carbono, e biliverdina. O mecanismo subjacente a este efeito citoprotetor depende da capacidade de HO-1 catabolizar o grupamento heme livre e impedir que as células sofram morte celular programada (GOZZELINO, JENEY e SOARES, 2010). O indutor de HO-1 CoPPiX diminuiu o tempo de imobilidade no TSC (dados não mostrados), sugerindo pela primeira vez que HO-1 é um novo alvo da ação antidepressiva de alguns compostos. Além disso, a creatina em uma dose sub-efetiva quando combinada com CoPPiX produziu um efeito antidepressivo sinérgico no TSC. Reforçando a hipótese que o efeito antidepressivo da creatina envolve a indução de HO-1, um inibidor de HO-1, Zn (II)PPIX, bloqueou o efeito tipo-

antidepressivo da creatina no TSC. Além disso, um estudo *in vitro* demonstrou que antidepressivos aumentam a expressão de HO-1 (LIN *et al.*, 2012). Um estudo prévio do nosso grupo demonstrou que camundongos *knockdown* para Nrf2 induziu um comportamento tipo-depressivo (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013), reforçando que a modulação de HO-1 seja um alvo importante na fisiopatologia e tratamento da depressão. A mTOR é uma serina/treonina cinase, que regula a iniciação da tradução de proteínas. Ela é expressa ubiquamente, incluindo processos dendríticos onde pode controlar a síntese proteica e sinaptogênese (DUMAN *et al.*, 2012). A estimulação da mTOR ocorre através da fosforilação de um domínio específico por AKT. A ativação de mTOR leva à fosforilação e ativação de p70S6 cinase e da repressão das proteínas inibidoras de ligantes de 4E. A estimulação da p70S6 cinase, por sua vez controla uma série de alvos moleculares, incluindo a síntese da subunidade ribossômica S6, a fosforilação do cofator da RNA helicase eIF4A, e a inibição do fator eucariótico de alongamento 2 (eEF2) (HOEFFER e KLANN, 2010). Investigou-se o envolvimento de mTOR no efeito antidepressivo da creatina no TSC pelo tratamento de camundongos com rapamicina, um inibidor da atividade desta proteína. No presente estudo, a administração de rapamicina aboliu a redução no tempo de imobilidade no TSC causada pelo tratamento de camundongos com creatina. Estes resultados sugerem que a ativação de mTOR pela PI3K tem um papel fundamental para o efeito antidepressivo da creatina. Nossos resultados são similares a um estudo prévio do nosso grupo, que mostrou que a rapamicina bloqueou o efeito antidepressivo da guanosina no TSC (BETTIO *et al.*, 2012). Assim, alguns estudos demonstraram que LY294002 e rapamicina reprimem a atividade da creatina cinase muscular em células C2C12, sugerindo que a AKT e mTOR desempenham um papel importante na atividade da creatina cinase (SUMITANI *et al.*, 2002). Além disso, a rapamicina bloqueou a diferenciação de células C2C12 induzida pela creatina, sugerindo que a cinase mTOR/P70S6 poderia ser potencialmente envolvida no efeito induzido pela creatina na diferenciação de células musculares (DELDICQUE *et al.*, 2007).

Além disso, não podemos descartar a hipótese de que a creatina pode modular outros alvos intracelulares como CaMK-2, uma vez que um estudo neuroquímico revelou que a injeção intrahipocampal aguda de creatina em ratos aumentou os níveis de pCaMK-2 (SOUZA *et al.*, 2012). Nossos resultados também

reforçam a hipótese que o efeito antidepressivo da creatina é dependente de uma ativação de CaMK-2, visto que KN62 também reverteu o efeito tipo-antidepressivo da creatina no TSC.

Acreditamos que os resultados deste estudo fornecem dados claros e inovadores da participação de PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ /HO-1/mTOR no efeito antidepressivo da creatina e a possível hipótese molecular ativada pelo tratamento com creatina em camundongos é exemplificada na Figura 40. No entanto, os resultados obtidos com o TSC devem ser considerados com cautela e mais estudos com modelos animais de depressão e paradigmas clínicos são bem vindos.

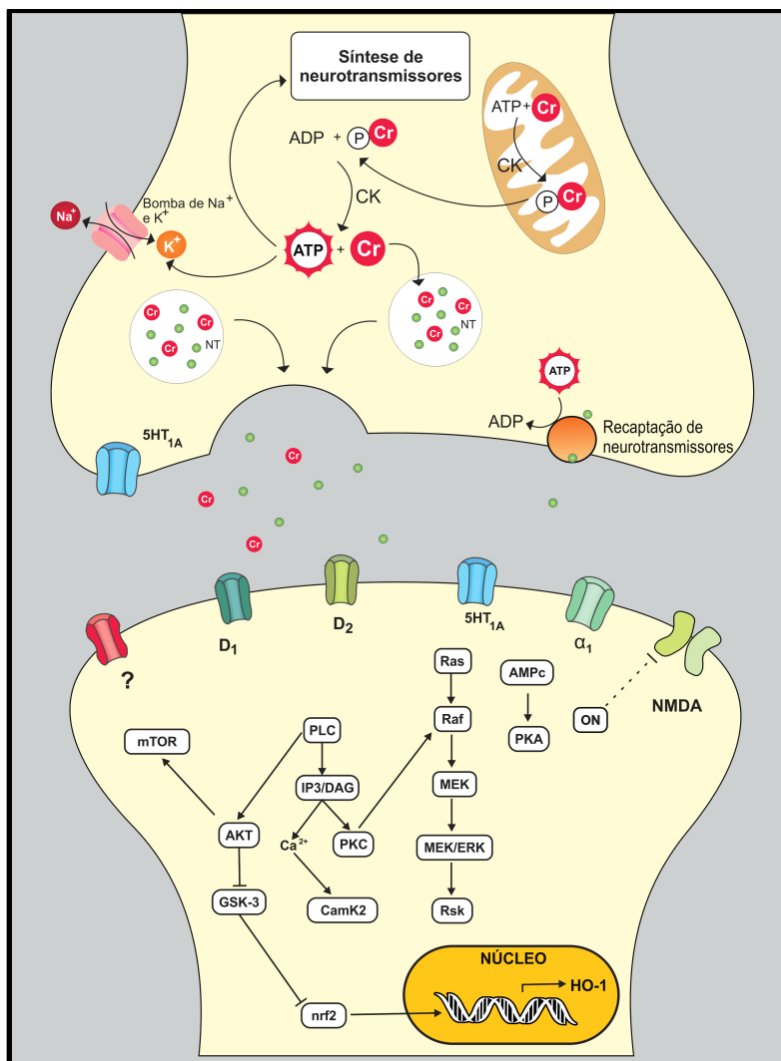


**Figura 40. Modelo experimental do mecanismo de ação molecular, através da ativação de PI3K/AKT e seus alvos intracelulares, induzido pelo tratamento com creatina responsável por seu efeito antidepressivo.** Creatina quando administrada agudamente apresenta efeito antidepressivo no TSC, sendo este efeito revertido por LY24002, wortmanina, rapamicina e ZnPP, sugerindo uma possível participação da via de sinalização intracelular mediada por PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  e HO-1 no efeito antidepressivo da creatina.



## 6. CONCLUSÕES

Demonstramos que a creatina apresenta efeito tipo-antidepressivo no TSC, e este efeito parece ser dependente de uma ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos e  $\alpha_1$ -adrenérgicos, bem como uma inibição dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos e NMDA, além de um aumento na síntese de ON. Além disso, acreditamos que o efeito antidepressivo da creatina no TSC seja dependente de uma ativação de vias de sinalização intracelular mediada por PI3K/AKT, Nrf2/HO-1, mTOR, PKA, PKC, MEK/ERK 1/2, e CaMK-2 e de uma inibição de GSK-3 $\beta$ . Sugerimos que a creatina possa ser uma importante estratégia terapêutica em condições clínicas nas quais ocorra um comprometimento de sistemas de neurotransmissão serotoninérgico e glutamatérgico, como é o caso da depressão. Um esquema com todos os sistemas de neurotransmissão e as vias de sinalização intracelular mediada por distintas cinases moduladas pelo tratamento com creatina está proposto na Figura 41.



**Figura 41. Modelo experimental final dos mecanismos de ação implicados no efeito antidepressivo da creatina.** O efeito antidepressivo da creatina envolve ativação de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, α<sub>1</sub>-adrenérgicos, 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos e inibição de receptores glutamatérgicos NMDA e 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos. Além disso, a modulação monoaminérgica e glutamatérgica promove a ativação de vias de sinalização intracelular dependentes da PKC, PKA, MEK/ERK 1/2, CaMK-2, AKT/GSK-3β, Nrf2/HO-1.

## Capítulo 2

*Efeito neuroprotetor da creatina na morte celular induzida pela toxina dopaminérgica 6-OHDA: Envolvimento das vias de sinalização intracelular.*

Os resultados deste capítulo geraram as seguintes publicações:

- 1) Cunha MP, Martín-de-Saavedra MD, Romero A, Parada E, Egea J, Del Barrio L, Rodrigues AL, López MG. Protective effect of creatine against 6-hydroxydopamine-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of intracellular signaling pathways. *Neuroscience*. 238:185-94, 2013.
- 2) Mauricio Peña Cunha, Maria D. Martín-de-Saavedra, Alejandro Romero, Javier Egea, Fabiana K. Ludka, Carla I. Tasca, Marcelo Farina, Ana Lúcia S. Rodrigues, Manuela G. López. Neurotoxicity induced by 6-OHDA in the rat striatal slices can be prevented by creatine and phosphocreatine: Involvement of PI3K/AKT signaling pathway. (Artigo em fase de preparação).

*A vida sem ciência é uma espécie de morte  
(Sócrates)*



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. DOENÇA DE PARKINSON (DP)**

#### **1.1.1. Histórico**

O tremor é um sintoma da DP e vem sendo descrito em textos médicos orientais desde 5000 a.c., chegando à cultura ocidental através de livros de ficção científica e biografias de diversos autores como Leonardo da Vinci e William Shakespeare, que citavam a paralisia agitante de forma variada e heterogênea. Em 1690, o médico húngaro Ferenc Páriz descreveu a paralisia agitante, em seu tratado médico *Pax corporis*, como tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. Cem anos depois, o médico inglês James Parkinson definiu de forma similar a Ferenc Páriz os sintomas da DP em sua célebre monografia intitulada “*An Essay on the shaking palsy*” (1817). Parkinson relatou dois sintomas chaves da doença: i) tremor de repouso e ii) marcha festinante. Na evolução da doença, Parkinson relatou também outros sintomas como a assimetria, disartria e quedas frequentes, e sintomas não motores como a obstipação progressiva, dificuldades de deglutição, sialorréia e incontinência urinária. Ainda, Parkinson acreditava que o intelecto e os sentidos dos pacientes encontravam-se intactos.

Entre 1860-1890, o médico francês Jean Charcot diferenciou os sintomas clínicos da esclerose múltipla e da paralisia agitante (GOETZ, 2002). Charcot diferenciou os tremores em relação à frequência e a amplitude de episódios de movimento e repouso. Nos pacientes com tremor de repouso, Charcot observou rigidez, dificuldade de equilíbrio e lentidão nos movimentos. Já o tremor de movimento estava associado à fraqueza muscular, prejuízos sensoriais, problemas visuais e nistagmo, que estão presentes na esclerose múltipla (GOETZ, 2002). Charcot posteriormente descreveu, ainda, com detalhes os quatro sinais cardinais da DP: i) tremor de repouso, ii) bradicinesia, iii) alterações posturais e de marcha, iv) rigidez muscular. Charcot demonstrou que na DP existia também um grande acometimento das funções cognitivas e da memória, sintomas bem aceitos nos dias atuais dentro da etiologia da DP. Ainda, Charcot definiu que a DP apresentava algumas alterações psiquiátricas, como depressão, catatonia, histeria e ausências na qual ele atribuiu à nomenclatura de neurose. Ainda, Charcot introduziu no tratamento da DP, os anticolinérgicos como o

alcalóide solanáceo hiosciamina. Os anticolinérgicos foram somente substituídos, após a descoberta da L-Dopa, em 1968.

Charcot observou parkinsonismo em um paciente tuberculoso, cujo exame post-mortem acusou câncer no lócus niger (PARENT e PARENT, 2010). Em 1895, Édouard Brissaud formulou uma hipótese que o lócus niger (atualmente conhecido como *substantia nigra*) estava envolvido na fisiopatologia da DP. Estes achados foram confirmados por Konstantin Trétiakoff que observou uma redução no número de células pigmentadas na *substantia nigra* do mesencéfalo em pacientes com a DP (BUDA *et al.*, 2009). Trétiakoff também observou inclusões citoplasmáticas nas células da *substantia nigra*, posteriormente descritas por Fritz Lewi como marcadores para a DP. Concomitantemente, o neurologista Alexander Kinnier Wilson descreveu que lesões nos núcleos da base poderiam gerar distúrbios de movimento (DENNY-BROWN, 1962).

Na metade do século XX os trabalhos de Arvid Carlsson impulsionaram o conhecimento dos aspectos fisiológicos, farmacológicos e patológicos do envolvimento dos núcleos da base no desenvolvimento de distúrbios do movimento. Carlsson descreveu que os prejuízos motores induzidos pela administração de reserpina em coelhos eram completamente revertidos pelo tratamento dos animais com um precursor de dopamina (DOPA) (CARLSSON, 1959b; IVERSEN e IVERSEN, 2007).

L-DOPA foi inicialmente isolada em 1913 da vagem da fava ordinária (*Vicia foba*). Entretanto, somente em 1938, com a descoberta da função da enzima dopa descarboxilase na conversão enzimática de DOPA em dopamina que a L-DOPA ganha destaque nos estudos científicos (HORNYKIEWICZ, 2002). Ao contrário da dopamina, a L-DOPA ultrapassa a barreira hematoencefálica e Carlsson e colaboradores demonstraram assim que a administração de DL-DOPA produzia uma reversão das alterações motoras induzidas pela reserpina (CARLSSON, LINDQVIST e MAGNUSSON, 1957). Ainda, um estudo posterior demonstrou uma distribuição de dopamina em todos os núcleos da base, sugerindo um importante papel do metabolismo da dopamina na fisiopatologia e tratamento da DP (CARLSSON, 1959a). Dois estudos simultâneos e em paralelo demonstraram em ensaios *post-mortem* uma deficiência dopaminérgica em circuitos subcorticais em pacientes com a DP (BARBEAU, 1960; EHRINGER e HORNYKIEWICZ, 1960). Nos anos subsequentes, estudos demonstraram que infusões endovenosas e administrações orais de L-DOPA induziam melhoras nos

parâmetros motores em pacientes com a DP (BIRKMAYER e HORNYKIEWICZ, 1961; COTZIAS, 1968; COTZIAS, PAPAVASILIOU e GELLENE, 1968). Em seguida, Olivier Sacks descreveu sérios efeitos adversos (motor e psiquiátrico) em decorrência do tratamento com L-DOPA (SACKS *et al.*, 1970<sub>a/b/c</sub>). Atualmente, sabe-se que a discinesia em decorrência do tratamento com L-DOPA afeta cerca de 50% dos pacientes tratados a longo prazo (LINAZASORO, 2005). Embora a L-DOPA tenha sido introduzida no mercado há quase 50 anos, as discinesias em decorrência deste tratamento ainda continuam sendo um grande mistério e objeto de estudos para médicos e pesquisadores.

### 1.1.2. Prevalência

A projeção para 2040 é que as doenças neurodegenerativas (Doença de Parkinson, doença do neurônio motor e demências) sejam a segunda causa de morte em idosos (LILIENTHAL e PERL, 1993; 1994). Dentro deste contexto, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente (atrás somente da doença de Alzheimer), acometendo 1 a 2% da população mundial acima dos 65 anos (BEAL, 2003). Os homens são mais frequentemente afetados que as mulheres (LANG e LOZANO, 1998). A prevalência de DP é de 0,3% da população geral e essa proporção aumenta com a idade, de modo que a doença afeta mais de 1% das pessoas com idade acima de 65 anos (TANNER, 1992).

### 1.1.3. Caracterização, sintomas e diagnóstico

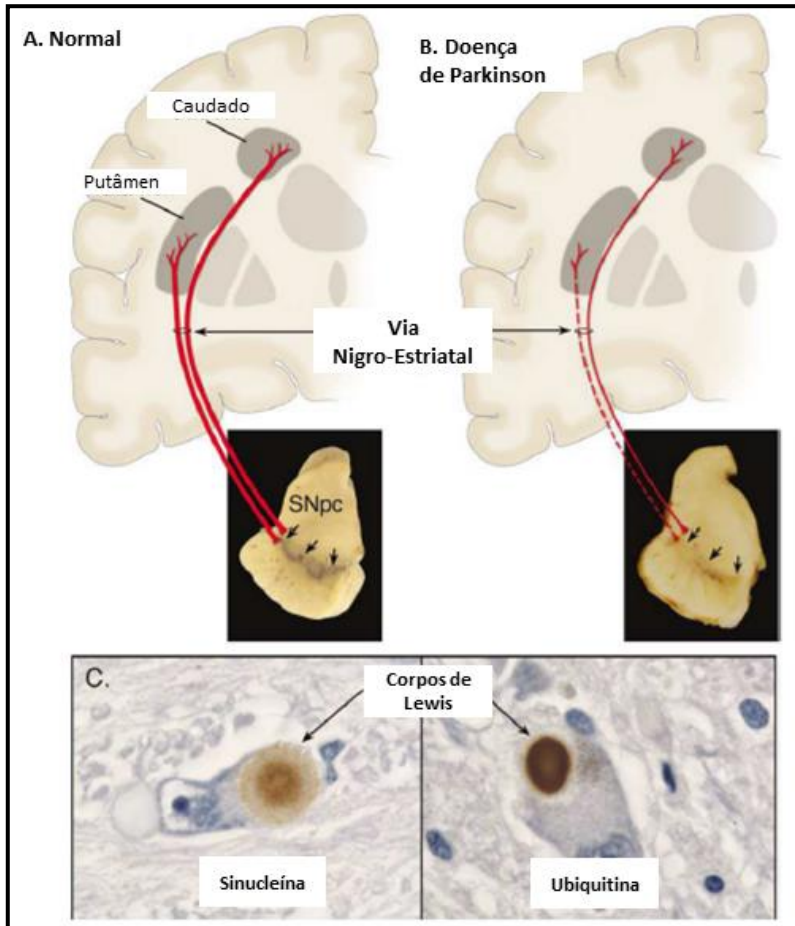
A DP é uma doença neurodegenerativa cujo diagnóstico baseia-se em manifestações clínicas, uma vez que não existem ferramentas laboratoriais de diagnóstico para esta doença (JANKOVIC, 2008). Os critérios de detecção da doença descritos por Charcot foram atualizados e revisados pela UK Parkinson's Disease Society e pela National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS), possibilitando uma acurácia no diagnóstico de cerca de 75% (GELB, OLIVER e GILMAN, 1999). A tríade clássica dos sintomas da DP é composta por tremor, rigidez e bradicinesia (GELB, OLIVER e GILMAN, 1999). Estes sintomas motores só se manifestam em estágios avançados da doença, nos quais 60-70% dos neurônios da substância negra *pars compacta* encontram-se degenerados e 70-80% dos níveis de dopamina no estriado cerebral encontram-se depletados (RIEDERER e WUKETICH, 1976). Atualmente, vários estudos têm demonstrado que os sintomas não

motores da DP, tais como depressão, psicose e distúrbios do sono, são bastante prevalentes em pacientes portadores da doença (CHAUDHURI *et al.*, 2006).

A principal característica da DP é a morte progressiva de populações selecionadas, mas heterogêneas de neurônios, incluindo os neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, associada ao aparecimento de inclusões intraneuronais chamadas de “corpos de Lewis” na substância negra (HASSLER, 1938; HORNYKIEWICZ, 1966).

Além disso, neurônios dos núcleos aminérgicos do tronco cerebral (catecolaminérgicos e serotoninérgicos) e do núcleo basal de Meynert (colinérgico), neurônios hipotalâmicos e corticais (particularmente no giro cingulado e córtex entorrinal), bem como o bulbo olfatório, gânglios simpáticos e neurônios parassimpáticos no intestino também são acometidos na DP (STOOF *et al.*, 1999; SCHULZ e FALKENBURGER, 2004). Sabe-se que a neurodegeneração da substância negra *pars compacta* resulta em uma perda das inervações do estriado (putâmen e núcleo caudado), que são acompanhadas por uma diminuição da biodisponibilidade de dopamina no estriado (HUGHES *et al.*, 1992). A Figura 42 exemplifica as principais alterações bioquímicas e morfológicas envolvidas na fisiopatologia da DP.





**Figura 42. Fisiopatologia da DP.** Representação esquemática da via nigroestriatal sem estar acometido por patologias (A) e na DP (B). Em C imunohistoquímica marcando inclusões intracelulares em neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* em encéfalos *post-mortem* de portadores da DP. SNpc: substância negra *pars compacta* (Adaptado de DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

É notório que a DP, além de estar fortemente associada com o envelhecimento, tenha uma etiologia genética (genes que codificam as proteínas  $\alpha$ -sinucleína e parkina estão sendo altamente correlacionados com o desenvolvimento da DP), bem como a exposição a algumas toxinas, traumas no cérebro, hipóxias,

infecções, como a encefalite viral e associações com outras doenças como a doença de Alzheimer e de Huntington (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; VILA e PRZEDBORSKI, 2003; FAHN e SULZER, 2004; HALD e LOTHARIUS, 2005). Entretanto muitos casos da DP apresentam ainda causas idiopáticas (desconhecidas) (MATTSON, GLEICHMANN e CHENG, 2008).

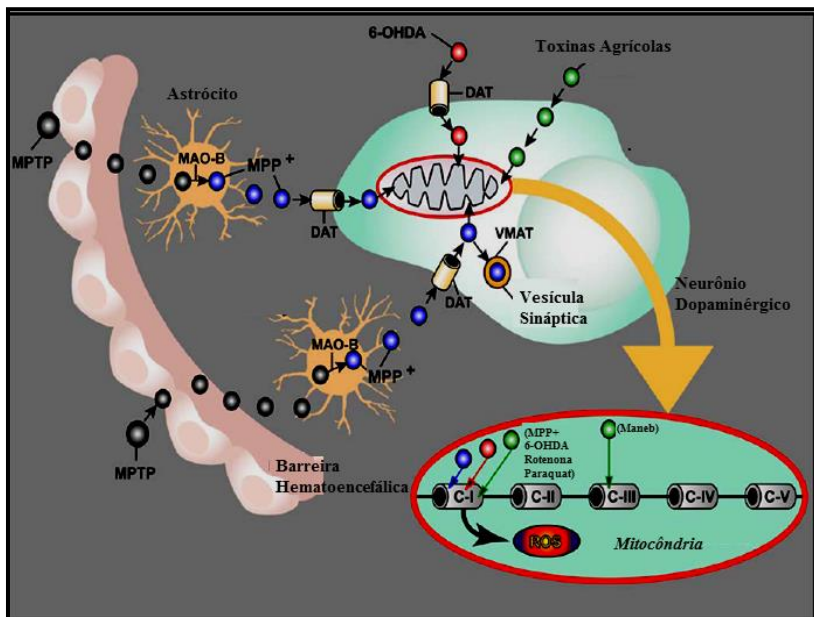
Atualmente, alguns estudos têm reforçado a hipótese que na DP exista um severo comprometimento da função mitocondrial com consequente aumento de estresse oxidativo e processos inflamatórios, resultando em morte neuronal (BEAL, 2003; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SINGH e DIKSHIT, 2007; REALE *et al.*, 2009). Estudos com clássicos modelos farmacológicos da DP induzidos pelas toxinas MPTP e rotenona já demonstraram que tais toxinas inibem a atividade do complexo 1 mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons (HEIKKILA *et al.*, 1985; GREENAMYRE, BETARBET e SHERER, 2003). Além disso, pacientes com a DP idiopática apresentam uma diminuição de 30 a 40% da atividade do complexo 1 mitocondrial na substância negra (BINDOFF *et al.*, 1989; SCHAPIRA *et al.*, 1990), embora os outros complexos da cadeia transportadora de elétrons sejam mantidas inalterados (PARKER, BOYSON e PARKS, 1989; HAAS *et al.*, 1995). O estresse oxidativo é outro fator amplamente prevalente na DP, visto que pacientes com a doença apresentam diminuições nos níveis de glutatona o que deixa os neurônios mais susceptíveis a um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (IBI *et al.*, 1999). Além disso, um modelo farmacológico da DP pela administração de 6-OHDA gera aumentos pronunciados nas espécies reativas de oxigênio (HEIKKILA e COHEN, 1971). A inflamação também vem sendo amplamente correlacionada com a DP, visto que estudos reportam que no líquido cérebro espinhal de pacientes com a DP existem níveis aumentados de marcadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interleucina  $1\beta$  (HIRSCH, HUNOT e HARTMANN, 2005). Neste contexto, as células gliais têm um papel fundamental na DP, visto que elas regulam os processos homeostáticos cerebrais (VILA *et al.*, 2001; VILA e PRZEDBORSKI, 2003). Em pacientes com a DP já foi verificado uma perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra associada com uma hiperativação glial (FORNO *et al.*, 1992; TEISMANN *et al.*, 2003).

Embora o tratamento para esta doença atualmente melhore a qualidade de vida e aumente a sobrevida dos pacientes, a DP

continua causando progressiva incapacidade e aumento da mortalidade (LEES *et al.*, 2001; FALL *et al.*, 2003).

#### **1.1.4. Modelos *in vivo* e *in vitro* da DP**

Diversos são os modelos farmacológicos da DP: indução através da administração de toxinas como MPTP, MPP<sup>+</sup>, 6-OHDA, rotenona, reserpina, dentre outras. Acredita-se que cada modelo tenha a sua particularidade, visto que muitos compostos dotados de ação neuroprotetora são hábeis em proteger em um modelo, porem são inefetivos em outros (OH *et al.*, 1995; CARRASCO, CASPER e WERNER, 2005; BLESÁ *et al.*, 2012; JACKSON-LEWIS, BLESÁ e PRZEDBORSKI, 2012), denotando assim que as vias de apoptose (morte celular programada) induzidas por estas toxinas são distintas (CHOI *et al.*, 1999) Por exemplo, tanto a toxina 6-OHDA quanto o MPP<sup>+</sup> são transportados em células dopaminérgicas devido à alta afinidade por transportadores de dopamina, entretanto o MPP<sup>+</sup> é sequestrado pela mitocôndria das células dopaminérgicas e exerce uma inibição do complexo mitocondrial 1 da cadeia transportadora de elétrons, enquanto a toxina 6-OHDA é auto-oxidada no citosol gerando espécies reativas de oxigênio. Já a reserpina inibe o transportador de monoaminas vesicular (TMAV-2) e assim impede a compartimentalização das monoaminas em vesículas sinápticas e a subsequente exocitose das mesmas (VERHEIJ e COOLS, 2007), promovendo uma grande diminuição dos níveis de dopamina (CARLSSON *et al.*, 1958). A Figura 43 exemplifica as alterações bioquímicas desencadeadas por toxinas dopaminérgicas.



**Figura 43. Representação esquemática do metabolismo do MPTP, das vias do MPP<sup>+</sup> intracelular, bem como das toxinas 6-OHDA, rotenona, Paraquat e Maneb.** Diversas são as toxinas que induzem sintomas da DP: i) A 6-OHDA apresenta similaridades estruturais com a dopamina e entra no neurônio dopaminérgico através de transportadores de dopamina e dentro do citosol dos mesmos se autooxida produzindo espécies reativas de oxigênio e apoptose; ii) A toxina MPTP passa a barreira hematoencefálica e nos astrócitos é convertida em um metabólito ativo, denominado MPP<sup>+</sup>, e este sai dos astrócitos e entra nos neurônios dopaminérgicos através de transportadores de dopamina levando a inibição do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, déficits energéticos e apoptose; iii) Outras toxinas como a rotenona e o paraquat também promovem inibição do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e geram processos apoptóticos e morte dos neurônios dopaminérgicos; iv) Já toxinas que inibem o complexo 2 mitocondrial também induzem a morte de neurônios dopaminérgicos (adaptado de SCHÖBER, 2004).

### 1.1.5. Comorbidade entre a depressão e a DP

A depressão apresenta uma grande comorbidade com diversas doenças, incluindo a DP (MENZA *et al.*, 2009). A DP afeta cerca de 1 milhão de pessoas somente nos EUA, dos quais 50% desses pacientes apresentam depressão (MENZA *et al.*, 2009). A depressão é hoje reconhecida como o distúrbio neuropsiquiátrico mais comum na DP, embora a sua frequência, características, curso, tratamento e

substrato neurobiológico estejam ainda apenas parcialmente esclarecidos (MENTIS e DELALOT, 2005).

A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos com déficit energético e morte celular. A neurotoxicidade induzida pelo 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é utilizada como modelo experimental de Parkinson há alguns anos (LANGSTON e BALLARD, 1983; HEIKKILA *et al.*, 1984). O MPTP é convertido a MPP<sup>+</sup>, o qual inibe o complexo mitocondrial I produzindo déficits na fosforilação oxidativa e na subsequente produção de ATP. A literatura reporta que o modelo experimental de Parkinson induzido por MPTP gera aumento no tempo de imobilidade no TNF (KRYZHANOVSKII, KRUPINA e KUCHERIANU, 1995<sub>a/b</sub>) e no teste de suspensão pela cauda (TSC) (MORI *et al.*, 2005; OHASHI *et al.*, 2006; MINEMATSU e NAKAJIMA, 2008; VUCKOVIC *et al.*, 2008), comportamentos considerados tipo-depressivo nestes testes, além de gerar um comportamento tipo-anedônico no teste de preferência por sacarose (KRYZHANOVSKII, KRUPINA e KUCHERIANU, 1995<sub>a/b</sub>). É válido ressaltar que o efeito tipo-depressivo da administração de MPTP parece ser específico, ou seja, independente dos efeitos locomotores, visto que as doses do MPTP que alteram o tempo de imobilidade nos testes de predição de depressão não altera a locomoção dos animais. Além disso, tratamentos farmacológicos com anti-parkinsonianos Levodopa (L-DOPA), bromocriptina (agonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>) e deprenil (inibidor da enzima MAO-B) reverterem o efeito tipo-depressivo induzido pelo MPTP no TSC (MORI *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que um análogo de MPTP gera diminuições dos níveis de NA e 5-HT no hipocampo e córtex frontal, sendo que essas alterações foram revertidas pelo tratamento com fluoxetina e desipramina (ANDREWS e MURPHY, 1993). Acrescentando, um estudo reportou que a administração de MPTP diminuiu o tempo de natação de camundongos no TNF, e este comportamento foi revertido por inibidores da enzima glicogênio sintase cinase 3β (GSK3β), sugerindo que a ativação de importantes alvos celulares seja necessária no tratamento em casos nos quais a depressão coexista com a DP (WANG *et al.*, 2007). Este mesmo estudo demonstrou que o inibidor da enzima GSK-3β, AR-A014418 (composto com propriedade antidepressiva já descrita na literatura), protege contra a neurotoxicidade induzida por MPTP (WANG *et al.*, 2007; ROSA *et al.*, 2008). Ainda, é notório que uma das alterações fisiológicas mais

associadas à depressão é o aumento dos níveis de cortisol em humanos e de corticosterona em roedores. Nesse sentido, (KAKU *et al.*, 1999) demonstraram que a administração de MPTP gera aumentos significativos de corticosterona em camundongos. Além disso, o potencial envolvimento da hipersecreção de citocinas associada com a ativação do sistema imune vem sendo amplamente associado à etiologia depressiva (SMITH, 1991; CONNOR e LEONARD, 1998; DANTZER *et al.*, 1999a; DANTZER *et al.*, 1999b; CHARLTON, 2000). Neste sentido, a administração de MPTP parece aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) (KAKU *et al.*, 1999). Outro modelo da DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) gera aumento do tempo de imobilidade no TNF (TADAIESKY *et al.*, 2008) e reverte o efeito antidepressivo de antidepressivos ISRS como a paroxetina e o citalopram, mas não de antidepressivos tricíclicos como a imipramina e a desipramina, no TNF (CHENU, DAILLY e BOURIN, 2007). Além disso, a administração de reserpina, um depletador dos níveis de dopamina, causa anedonia em camundongos no teste de preferência por sacarose (SKALISZ *et al.*, 2002) e aumenta o tempo de imobilidade no TNF, um efeito tipo-depressivo (SHAH *et al.*, 2006). A tabela 7 exemplifica os principais sintomas clínicos comuns a depressão e a DP.

**Tabela 7. Sintomas comuns à DP e à depressão**

Sintomas	Doença de Parkinson	Depressão
<b>Motores</b>	Bradicinesia/Postura de parada	Alteração psicomotora (Hipo ou hiperlocomoção)
<b>Cognitivos</b>	Déficit de memória/ Déficit na concentração/ Indecisão	Déficit de memória/Déficit na concentração/Indecisão
<b>Vegetativos</b>	Alteração no sono e no apetite/Fadiga	Alteração no sono e no apetite / Fadiga
<b>Somáticos</b>	Desconfortos Físicos	Desconfortos Físicos

(Adaptado de MARSH, 2000).

### 1.1.6. Proteínas cinase envolvidas na fisiopatologia da DP

Déficit nas vias de sinalização intracelular mediada por AKT foi reportado na DP (BURKE, 2007). A sinalização intracelular mediada por AKT/GSK3 $\beta$  é importante no mecanismo

de receptores dopaminérgicos e para a regulação de transportadores dopaminérgicos (WEI *et al.*, 2007; BEAULIEU *et al.*, 2011). Além disso, as drogas que modulam o sistema dopaminérgico são utilizadas para tratar a DP e apresentam seu efeito neuroprotetor através da ativação de AKT (ZHANG *et al.*, 2012). Estas drogas incluem rasagilina, que promove uma fosforilação de AKT em seu resíduo de serina<sup>473</sup> no modelo da DP em roedores induzido pela toxina dopaminérgica MPTP (MANDEL, SAGI e AMIT, 2007). Consistente com este resultado, a transfecção em células que induz a fosforilação de AKT protege contra a morte celular induzida pela toxina dopaminérgica 6-OHDA (SIGNORE *et al.*, 2006). Além disso, GDNF, que protege contra a neurodegeneração dopaminérgica tem seu mecanismo de ação dependente da sinalização intracelular mediada por AKT e a ativação de AKT pode aumentar a expressão de fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) (SAGI *et al.*, 2007). Digno de nota, um recente estudo demonstrou que estabilizantes de humor como lítio e valproato, substâncias que classicamente promovem uma fosforilação de GSK-3 $\beta$ , reverterem os déficits não motores induzidos por MPTP em ratos (CASTRO *et al.*, 2012). A literatura reporta ainda que a morte celular induzida por toxinas dopaminérgicas como 6-OHDA é dependente da enzima GSK-3 $\beta$  (CHEN *et al.*, 2004). Além disso, alguns estudos reportam que inibidores de GSK-3 $\beta$  apresentam efeito neuroprotetor em relação a toxinas dopaminérgicas (WANG *et al.*, 2007; YONG *et al.*, 2011).

Ainda, leptina apresenta efeito neuroprotetor frente à morte celular induzida pela toxina dopaminérgica 6-OHDA e este efeito parece ser mediado por ERK 1/2 (WENG *et al.*, 2007). Tempol tem efeito neuroprotetor frente à morte celular induzida por MPP<sup>+</sup> e este efeito também é mediado pela ativação de ERK 1/2, reforçando a importância desta via de sinalização mediada por MAPKK/ERK 1/2 no efeito de neuroprotetor de diversos compostos frente à DP.

Um artigo demonstrou também a importância da CaMK-2 na fisiopatologia e tratamento da DP, visto que a toxina MPTP induziu uma diminuição na atividade de CaMK-2 no hipocampo de camundongos (MORIGUCHI, YABUKI e FUKUNAGA, 2012). Além disso, a PKA e a PKC alfa e delta tem sido implicadas no efeito neuroprotetor de diversos compostos (LEVITES *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2007; CARRASCO, WERNER e CASPER, 2008; TIONG, LU e BIAN, 2010).





## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando: i) o envolvimento de alterações metabólicas cerebrais na DP (SCHAPIRA *et al.*, 1990), ii) a grande comorbidade que existe entre a DP e a depressão, iii) creatina apresenta efeito antidepressivo e neuroprotetor em relação a distintas toxinas (MATTHEWS *et al.*, 1999; ANDRES *et al.*, 2005b,c), este capítulo tem o intuito de investigar o efeito neuroprotetor da creatina em relação à morte celular induzida pela toxina dopaminérgica 6-OHDA em ensaios *in vitro*, bem como os mecanismos moleculares e celulares que estão implicados neste efeito.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito neuroprotetor da creatina na morte celular induzida por 6-OHDA.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Investigar o efeito da 6-OHDA em ensaios de citotoxicidade (redução de MTT e liberação de lactato desidrogenase) em células de neuroblastoma humano e em fatias de estriados de ratos.
- ii. Investigar o efeito neuroprotetor da creatina frente à morte celular induzida por 6-OHDA em células SH-SY5Y.
- iii. Verificar o efeito de inibidores de cinases (LY294002, H-89, KN-62, PD98059, U0126, queleritrina) no efeito neuroprotetor da creatina em células SH-SY5Y.
- iv. Investigar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina frente à alteração na fosforilação de GSK-3 $\beta$ (Ser<sup>9</sup>) induzida por 6-OHDA em células SH-SY5Y.
- v. Analisar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina frente à morte celular induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.
- vi. Analisar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina frente à alteração na imunomarcação para tirosina hidroxilase induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.
- vii. Verificar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina frente ao aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.
- viii. Investigar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina frente à diminuição no potencial de membrana mitocondrial induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.
- ix. Investigar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina frente à alteração na fosforilação de AKT (Ser<sup>473</sup>) e GSK-3 $\beta$ (Ser<sup>9</sup>) induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.

- x. Verificar o efeito de LY294002 no efeito protetor da creatina e da fosfocreatina em fatias de estriado de ratos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Para os experimentos *in vitro* em fatias de estriado foram utilizados ratos Sprague–Dawley adultos machos (275–325 g) do biotério central da Universidad Autonoma de Madrid. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética da instituição.

### 4.2. DROGAS E REAGENTES

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas nos experimentos *in vitro*: Creatina monohidratada, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), H-89, N-[2-[[[3-(4-clorofenil)-2-propenil]metilamino]metil]fenil]-N-(2-hidroxi-etil)-4-metoxibenzenosulfonamida (KN-93), PD98059, U0126, queleritrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.), Eagle's minimum essential medium (EMEM), soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina (Gibco). Creatina e os inibidores de cinases foram diluídos em PBS com 0,1% de DMSO. 6-OHDA foi dissolvida em água deionizada com 0,1% de ácido ascórbico em uma concentração de 1 mM e a partir desta solução mãe foram realizadas diluições sucessivas. A solução de creatina foi sempre preparada no dia do experimento e dissolvida em EMEM/F-12 suplementado com 1% de soro fetal bovino e 0,1% de DMSO. Os controles experimentais recebiam 0,1% de DMSO diluído em EMEM/F-12 suplementado com 1% de soro fetal bovino.

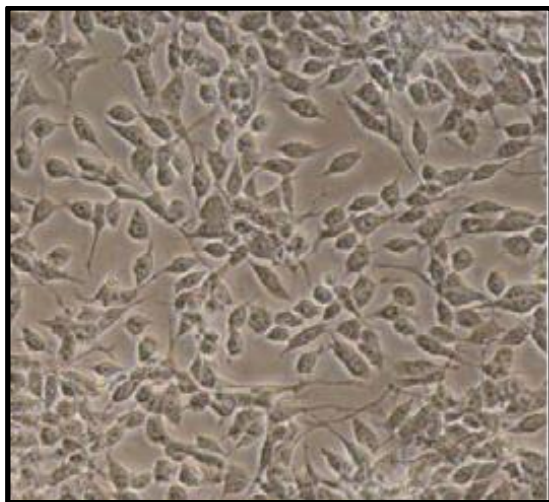
### 4.3. SH-SY5Y

SK-N-SH é uma linhagem de células que foi estabelecida em 1973 a partir de uma biópsia de medula óssea de uma criança do sexo feminino com 4 anos de idade com neuroblastoma (BIEDLER, HELSON, SPENGLER, 1973). Esta célula sofreu o processo de clonagem e subclonagem e deu origem a célula SH-SY5Y que foi primeiramente descrita em 1978 por BIEDLER et al. (1978). Estas células apresentam fenótipo catecolaminérgico e, como tal, têm sido amplamente utilizadas para estudar o efeito de toxinas que agem em células dopaminérgicas.

A linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 44) foi cedida gentilmente pelo Centro de Biología Molecular, Universidad Autonoma de Madrid/Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, Spain). As células SH-SY5Y foram mantidas em 1:1 com uma mistura de nutrientes F-12

(Ham12) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) e Eagle's minimum essential medium (EMEM) suplementado com 15 aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 10% de soro bovino fetal inativado por calor (SFB), 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina.

Culturas foram colocadas em frascos contendo meio suplementado e mantidos em monocamadas a uma temperatura de 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Culturas “stocks” foram repicadas ou subculturadas em três placas duas vezes na semana. Para análises experimentais, as células SH-SY5Y foram repicadas em placas de 48 poços (TPP, Zellkultur and Labortechnologie, Suíça), em uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. Células foram tratadas com as drogas em F-12/EMEM suplementado com 1% SFB. Todos os tratamentos foram realizados quando as células estavam em uma confluência de cerca de 65% nos poços, e ao fim do experimento a confluência da mesma se encontrava entre 80–90% de confluência. Todas as células deste estudo foram usadas em baixas passagens (<13) e foram mantidas em 10% de SFB sobre o tratamento com as drogas em questão. A Figura 44 mostra de forma ilustrativa as células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.



**Figura 44. Células SH-SY5Y**

#### 4.4. TRATAMENTOS EM CÉLULAS SH-SY5Y

As células foram tratadas com F-12/EMEM sozinha (meio com 1% SBF) ou F-12/EMEM (meio com 1% SBF) contendo 6-OHDA em doses crescentes de 10 a 300 $\mu$ M. A redução de MTT (3-[4,5 dimetiltiliazol-2-yl]-2,5-difenil-tetrazolium brometo) e a atividade da lactato desidrogenase (LDH) foram analisadas 24 h depois da incubação com 6-OHDA.

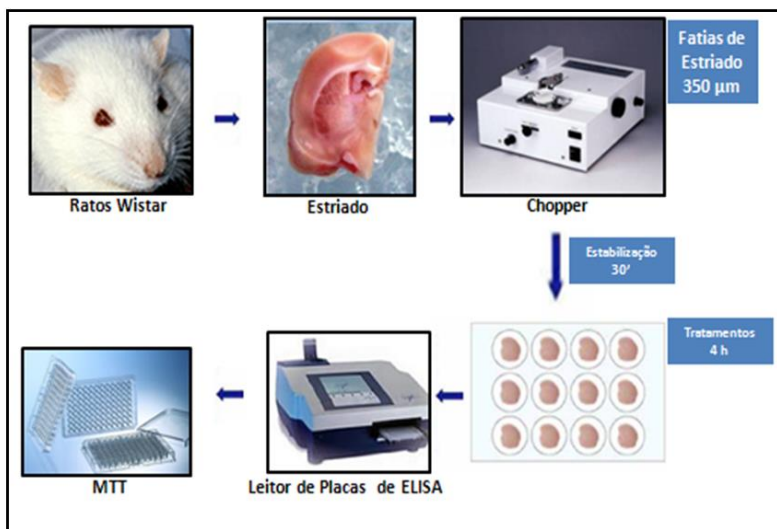
Além disso, com o objetivo de estudar o efeito protetor da creatina no protocolo de morte celular induzida por 6-OHDA, células SH-SY5Y foram co-incubadas (24 h durante a incubação com 6-OHDA) com creatina em concentrações crescentes de 100 a 5000  $\mu$ M, diluída em meio F-12/EMEM suplementado com 1% de SFB. A redução de MTT foi analisada 24 h após a adição de creatina. Em outro conjunto de experimentos, células SH-SY5Y foram pré-incubadas (24 h antes da adição de 6-OHDA) e co-incubada (24 h durante a incubação com 6-OHDA) com creatina em concentrações crescentes de 0,1 a 5000  $\mu$ M, diluída em F-12/EMEM suplementada com 1% de SBF. A redução de MTT foi analisada 48 h após a adição de creatina.

Com o objetivo de investigar os mecanismos de ação implicados no efeito neuroprotetor da creatina em relação à morte celular induzida por 6-OHDA, as células SH-SY5Y foram pré-incubadas com 10  $\mu$ M de LY294002 (inibidor de fosfatidilinositol-3 kinase, PI3K), 1  $\mu$ M de KN-93 (inibidor de proteína cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina- II, CaMK-2), 2  $\mu$ M de H-89 (inibidor da proteína cinase A, PKA), 10  $\mu$ M de PD98059 (inibidor da cinase da proteína cinase ativada por mitógenos, MEK1/2), 0,1  $\mu$ M de queleritrina (inibidor da proteína cinase C, PKC) 1 hora antes da adição de creatina e durante todo o período de incubação com creatina.

#### 4.5. PREPARAÇÃO DAS FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

Ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.) e subsequentemente decapitados. O cérebro anterior foi rapidamente removido da calota craniana e colocado no tampão de dissecação Krebs bicarbonato (p.H. 7.4), contendo (mM): NaCl 120, KCl 2,  $\text{CaCl}_2$  0.5,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $\text{MgSO}_4$  10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18, glicose 11 e sacarose 200. A solução foi pré-borbulhada com 95% de  $\text{O}_2$ /5% de  $\text{CO}_2$  por ao menos 45 min antes da imersão das fatias. O estriado foi levemente dissecado e seccionado em seções transversas de 350 (análise de MTT) ou 200  $\mu$ m de espessura (Fluorescência e análise

de liberação de lactato desidrogenase) usando um microfatiador de tecidos (Mc Ilwain Tissue Chopper, The Micle Laboratory Engineering Company). Em um período de estabilização de 30 minutos, as fatias foram incubadas em uma solução de Krebs com a seguinte composição (mM): NaCl 120, KCl 2,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $\text{MgSO}_4$  1.19,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.18 e glicose 11; esta solução foi imersa em 95% de  $\text{O}_2$ /5% de  $\text{CO}_2$ . Então, depois da pré-incubação na solução de Krebs, as fatias de estriado foram mantidas em um meio de incubação nutritivo com posto de 50% de Krebs e 50% de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), 20 mM de HEPES e 100 mg/ml de gentamicina, a 37°C em uma atmosfera de  $\text{CO}_2$ , como descrito em cultura de células organotípicas (GÄHWILER *et al.*, 1997). A Figura 45 demonstra de forma esquemática a preparação de fatias de estriado de ratos para análises experimentais.



**Figura 45. Metodologia de preparação e análise de viabilidade celular das fatias de estriado de ratos.** Ratos Sprague-Dawley machos são mortos por decapitação e seu encéfalo é dissecado para a determinação do estriado cerebral. O estriado então é microfatiado através de um microfatiador de tecidos chopper em fatias de 350µM. As fatias são colocadas em placas de 24 poços e passam por um processo de estabilização de 30 minutos e após esse período recebem o tratamento proposto por um período adicional de 4 horas. Após os tratamentos a viabilidade celular das fatias de estriado é analisada através de um leitor de placas de Elisa pelo método de redução de MTT.



#### 4.6. TRATAMENTOS DAS FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

Para investigar o efeito excitotóxico da 6-OHDA, esta toxina foi incubada em doses crescentes por um período de 4 horas (50-300  $\mu\text{M}$ ), diluída em meio de incubação descrito acima. Com o intuito de investigar o efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina na toxicidade induzida por 6-OHDA, estes compostos foram co-incubados com 6-OHDA por 4 horas. Além disso, com o objetivo de investigar o envolvimento da ativação da PI3K no efeito neuroprotetor da creatina ou fosfocreatina, o inibidor da PI3K, LY-294002 (30 $\mu\text{M}$ ) foi incubado por 30 min antes do começo e durante o co-tratamento com 6-OHDA + creatina ou fosfocreatina.

#### 4.7. QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR POR MENSURAÇÃO DO METABOLISMO DE MTT

A viabilidade celular das células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e das fatias de estriado de ratos foi determinada através da habilidade das células reduzirem MTT (MOSMANN, 1983). No fim do tratamento das células SH-SY5Y, o MTT foi adicionado em cada poço em uma concentração de 0,5 mg/ml em solução Krebs-HEPES (144 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, e 11 mM glucose; pH 7,3), e uma incubação a 37 °C foi realizada por um período de 2 horas. Fatias de estriado foram coletadas imediatamente depois da incubação com 6-OHDA na ausência ou presença de concentrações crescentes de creatina ou fosfocreatina (2.5-10 mM) e foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml) em uma solução de Krebs bicarbonato por 30 min a 37 °C.

O anel de tetrazólio de MTT pode ser clivado por desidrogenases ativas produzindo um sal precipitado denominado formazan. O formazan produzido foi solubilizado através da adição de 200  $\mu\text{l}$  de dimetil sulfoxido (DMSO), resultando em um composto colorido, cuja densidade ótica foi analisada em um leitor de placas a 540 nm (Labsystems iEMS reader MF).

#### 4.8. QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR POR MENSURAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A viabilidade das fatias de estriado de ratos e de células SH-SY5Y foram também monitoradas pela a atividade da enzima LDH liberada no meio de incubação (Sobrado et al., 2004), usando um kit comercial (Cytotoxicity Detection Kit, Roche) e seguindo as

indicações do fabricante. As amostras foram coletadas depois do período de tratamento com 6-OHDA na presença ou ausência de creatina ou fosfocreatina (2.5-10 mM). A atividade da LDH foi mensurada espectrofotometricamente em um leitor de microplacas a 490-600 nm (Labsystems iEMS reader MF).

#### 4.9. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

Com o intuito de mensurar as espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizamos uma sonda molecular H<sub>2</sub>DCFDA (HA *et al.*, 1997) que se difunde através da membrana celular e é hidrolisada por esterases intracelulares a uma forma não fluorescente diclorofluoresceína (DCFH). DCFH reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular e forma diclorofluoresceína (DCF), um composto com fluorescência verde. Imediatamente após as secções transversais de tecido com o microfatiador, as fatias de estriado são obtidas com 200 µm de espessura e são incubadas com 80 µM H<sub>2</sub>DCFDA por 45 min em solução de Krebs (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.19 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 11 mM glicose). A seguir, as fatias foram lavadas duas vezes com solução Krebs. A fluorescência foi mensurada em um microscópio invertido de fluorescência NIKON eclipse T2000-U. O Comprimento de onda da excitação e emissão foi 485 e 520 nm, respectivamente. As imagens dos núcleos globo pálido e putâmen foram registradas em ampliações de 100X. A análise de fluorescência foi realizada usando o programa Metamorph (7ª versão). Fluorescência em condições basais foi considerada 1 e as variáveis experimentais foram normalizadas em relação a este valor.

#### 4.10. ESTUDOS DE AUTOOXIDAÇÃO DE 6-OHDA

A autooxidação de 6-OHDA foi monitorada através de um espectrofotômetro pela formação *p*-quinona a 490 nm (SACHS e JONSSON, 1975; SOTO-OTERO *et al.*, 2000). A cubeta foi mantida à 37°C, e um agitador foi utilizado para realizar uma mistura contínua da amostra. Para cada ensaio, 2,5 ml de um meio de incubação nutritivo composto por 50% de solução de Krebs e 50% de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), 20 mM de HEPES e 100 µg/ml de gentamicina, a 37 ° C e em uma atmosfera de CO<sub>2</sub>, incubou-se numa microplaca durante 15 minutos para atingir a temperatura dada. Em seguida, a auto-oxidação foi iniciada com a adição da solução de estoque de 6-OHDA a uma

concentração final de 0,5 mM. O controle da cinética correspondente foi imediatamente iniciado e mantido por 5 min.

#### 4.11. WESTERN BLOT

Para detecção de proteínas, células SH-SY5Y ou fatias de estriado foram lisadas em 100  $\mu$ L de tampão de lise resfriado (1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto, 20 mM NaF, 1 mM pirofosfato de sódio, e 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Um tablete do coquetel de inibidor de proteases (complete Mini, Roche) foi adicionado para cada 10 mL de tampão. A concentração de proteína foi mensurada com um kit comercial (Millipore, Bedford, MA, USA). Equivalentes concentrações de proteínas (30  $\mu$ g) por grupo experimental foram utilizadas para a eletroforese em géis 10% de poliacrilamida desnaturado com dodecil sulfato de sódio. Depois de transferir a uma membrana Immobilon-P Transfer (Millipore, Bedford, MA, USA) em temperatura ambiente, membranas foram então bloqueadas em tampão Tris-salina com 0,05% Tween 20 (TTBS) contendo 5% de albumina, e incubada por 2 h em temperatura ambiente com anticorpo primário anti-p-AKT, anti-AKT, anti-p-GSK3 $\beta$ , anti-GSK3 $\beta$ , anti-tirosina hidroxilase e anti- $\beta$ -actina (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) e incubado por 1 h com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (1:10000). A membrana foi revelada utilizando reagentes quimioluminescentes (Amersham Biosciences). A densidade ótica foi quantificada utilizando o programa Scion Image® Alpha 4.0.3.2. Para as condições controle foram atribuídos os valores de 100% e as variáveis experimentais foram normalizadas em relação a este valor.

#### 4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados são expressos como média + E.P.M. Comparações entre grupos experimentais e grupos controle foram realizadas através de ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Newman-Keuls. Diferenças estatísticas foram aceitas quando  $P \leq 0.05$ .

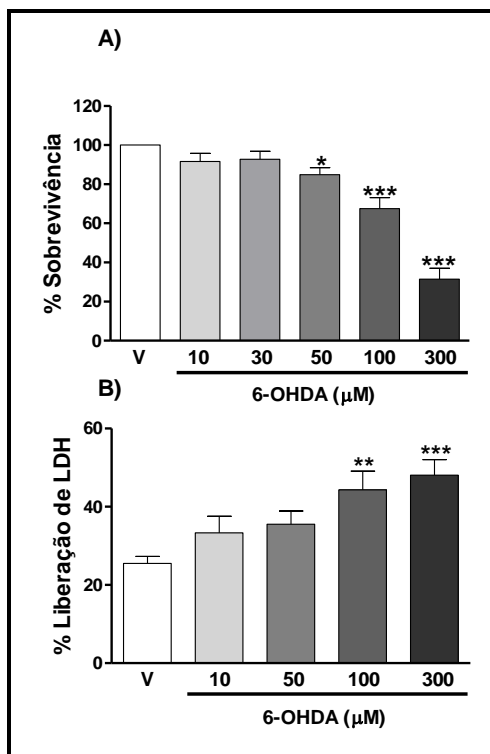


## 5. RESULTADOS

### 5.1. EFEITO DE 6-OHDA NA VIABILIDADE DE CÉLULAS SH-SY5Y

Inicialmente, examinamos o efeito de 6-OHDA na viabilidade das células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para este fim, as células foram incubadas com ou sem 6-OHDA, em concentrações de 10-300  $\mu\text{M}$  durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT e foi expressa como percentagem de células controle, isto é, as células incubadas durante 24 h apenas com meio de cultivo (100% de viabilidade celular).

A 6-OHDA, no intervalo de 50-300  $\mu\text{M}$ , significativamente diminuiu concentração-dependente a viabilidade celular (a viabilidade celular foi reduzida em 20% a 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA e em 60% a 300  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA) (Figura 45A). De acordo com esta redução na viabilidade das células, 6-OHDA aumentou também a liberação de LDH, especialmente nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{M}$ , outro forte indicativo de morte celular (Figura 45B).



**Figura 46. Toxicidade induzida por 6-OHDA em células de neuroblastoma humano.** A toxina 6-OHDA por 24 horas induziu morte celular concentração-dependente em células SH-SY5Y, quando a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução de MTT (Painel A) ou por liberação de LDH (Painel B). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  em relação ao grupo controle (V).

### 5.1.1. Discussão

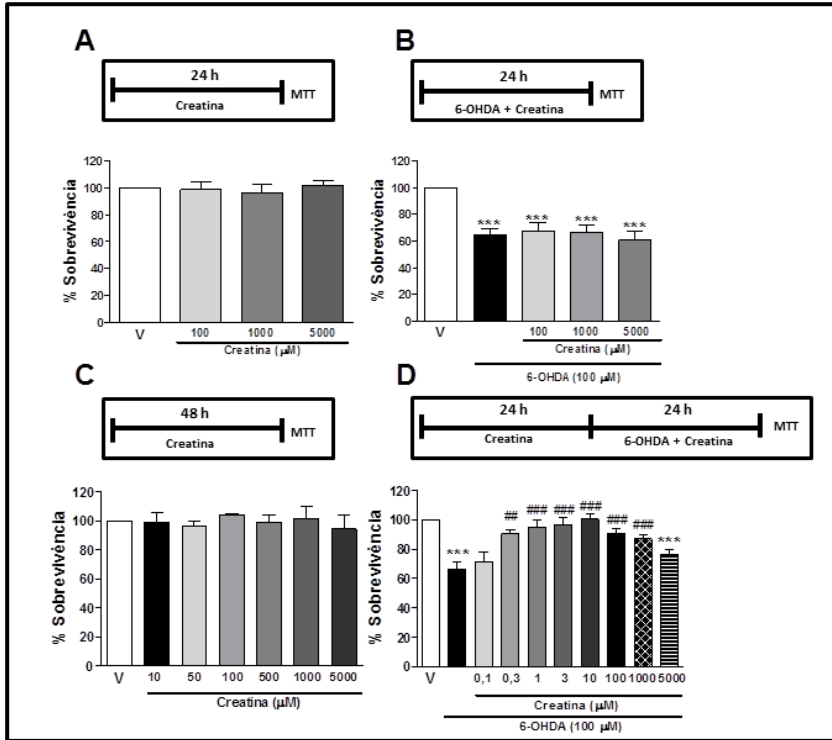
6-OHDA é uma neurotoxina potente que provoca degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Ela é utilizada para induzir modelos celulares e animais da DP por ser como uma neurotoxina seletiva para células catecolaminérgica (KOSTRZEWA e JACOBOWITZ, 1974; CADET *et al.*, 1989; PERUMAL *et al.*, 1989; KUMAR, AGARWAL e SETH, 1995). Vários estudos têm indicado que 6-OHDA induz a morte celular em células catecolaminérgicas de neuroblastoma humano SH-SY5Y (TIRMENSTEIN *et al.*, 2005; BAKOS *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012; OSSOLA *et al.*, 2012), de acordo com o presente estudo, no qual 6-OHDA no intervalo de doses de 100-300  $\mu$ M causou toxicidade em células SH-SY5Y, medido como uma diminuição da atividade metabólica (avaliada pelo teste de redução de MTT) e por um aumento na permeabilidade da membrana celular (avaliada por liberação de LDH no citosol celular).

## 5.2. EFEITO DA CREATINA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE 6-OHDA EM CÉLULAS SH-SY5Y

Alguns estudos reportam que a creatina apresenta papel neuroprotetor contra vários estímulos citotóxicos (BREWER e WALLIMANN, 2000; ANDRES *et al.*, 2005b; JURAVLEVA *et al.*, 2005; GENIUS *et al.*, 2012). Portanto, avaliamos se a creatina poderia proteger as células SH-SY5Y contra a toxicidade induzida por 6-OHDA. Para este propósito utilizamos duas condições experimentais. O primeiro protocolo consistiu em uma co-incubação com 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) e creatina durante 24 h. A exposição de células SH-SY5Y por 24 h à concentrações crescentes de creatina (100-5000  $\mu\text{M}$ ) não foi citotóxica (Figura 46A). Quando a creatina (100-5000  $\mu\text{M}$ ) foi co-incubada com 6-OHDA, nenhuma proteção frente à morte celular foi observada (Figura 46B). O segundo protocolo consistiu em pré-incubar as células durante 24 horas com creatina (0,1-5000  $\mu\text{M}$ ), seguido de uma co-incubação com creatina e 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) por mais 24 h. Inicialmente, avaliou-se a exposição das células SH-SY5Y por 48 h a creatina (10-5000  $\mu\text{M}$ ) e os resultados indicaram que este tratamento não foi citotóxico (Figura 46C).

Quando creatina (0,3-1000  $\mu\text{M}$ ) foi pré- e co-incubada com o estímulo tóxico, este composto apresentou efeito protetor frente à morte celular induzida por 6-OHDA. A maior proteção significativa alcançada foi observada quando as células foram incubadas com 10  $\mu\text{M}$  de creatina (aumento de 34% na sobrevivência das células, em comparação com o grupo incubado com 6-OHDA) (Figura 46D).





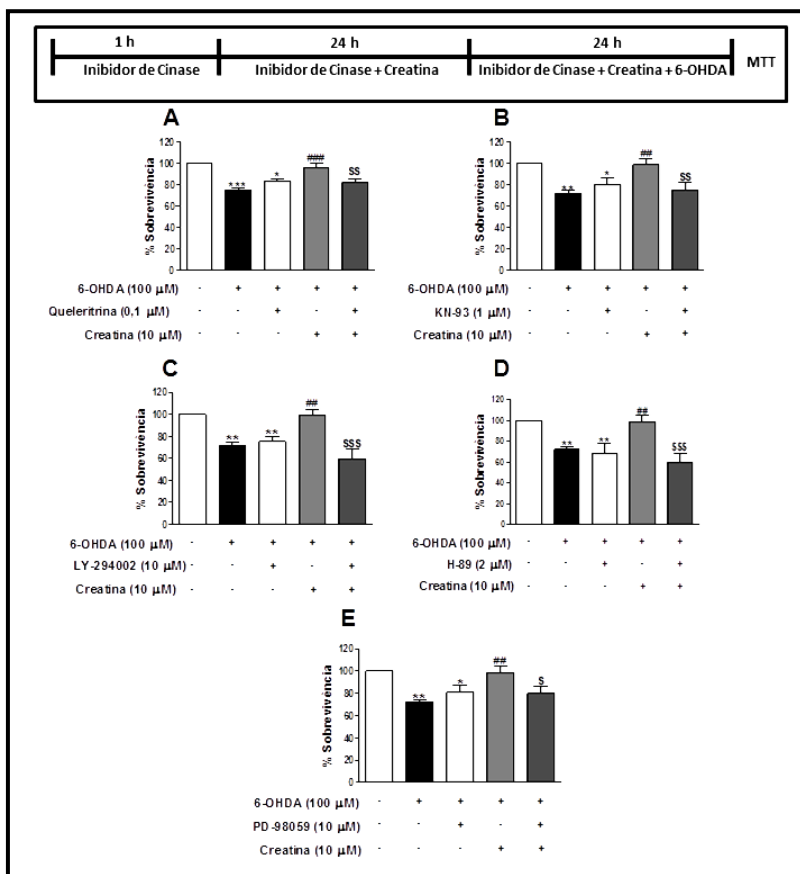
**Figura 47. Efeito protetor da creatina na morte de células SH-SY5Y induzida pelo tratamento com 6-OHDA.** O tratamento com creatina em concentrações crescentes (100-5000  $\mu$ M) por 24 h, não foi citotóxico per se (painel A). A co-incubação (24 h durante a incubação com 6-OHDA) das células SH-SY5Y com creatina (100-5000  $\mu$ M) não alterou os efeitos tóxicos induzidos por 6-OHDA (Painel B). A creatina em concentrações crescentes (0,1-5000  $\mu$ M), durante 48 h, não alterou a viabilidade celular (Painel C). A pré-incubação (24 h antes de 6-OHDA) e co-incubação (24 horas durante o tratamento com 6-OHDA) das células SH-SY5Y com creatina (0,1-5000  $\mu$ M) aumentou a viabilidade celular, em comparação com o grupo incubado apenas com 6-OHDA. Uma proteção máxima foi atingida com uma concentração de 10  $\mu$ M de creatina (Painel D). Os dados são apresentados como média + SEM de 6-10 passes celulares diferentes e independentes. \*\*\*P < 0,001 em relação ao grupo controle (V); ##P < 0,01 ou ###P < 0,001 em comparação com o grupo incubado com 100  $\mu$ M de 6-OHDA.

### 5.2.1. Discussão

No presente estudo, a creatina apresentou um efeito protetor na morte celular induzida pela 6-OHDA, sugerindo um efeito neuroprotetor deste composto na DP. Os resultados positivos obtidos com creatina em estudos experimentais levaram à sua utilização em ensaios clínicos em pacientes com a DP. Em um estudo piloto, a suplementação com creatina melhorou o humor de pacientes e levou a uma diminuição no incremento de doses da terapêutica clássica dopaminérgica (BENDER *et al.*, 2006). Além disso, a progressão da DP foi retardada por quase 50% ao longo de um período de observação de um ano em pacientes tratados com creatina (NINDS NET-PD INVESTIGATORS, 2006). Recentemente, o National Institute of Health anunciou um estudo clínico de fase III recrutando 1720 participantes randomizados que receberam 10 g de creatina ou placebo (BLOOM, 2007). No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o papel neuroprotetor da creatina contra a DP.

### 5.3. IMPLICAÇÃO DAS CINASES PI3K/AKT, PKA, PKC, MEK1/2 E CAMK-2 NO EFEITO PROTETOR DA CREATINA EM CÉLULAS SH-SY5Y

De modo a investigar o mecanismo de ação por trás do efeito protetor da creatina contra a morte celular induzida por 6-OHDA, diferentes inibidores de cinase foram utilizados empregando o protocolo indicado na parte superior da Figura 47. Sob estas condições experimentais, o inibidor PI3K/AKT (LY294002, 10  $\mu$ M), o inibidor de PKA (H-89, 2  $\mu$ M), o inibidor de PKC (queleritrina, 0,1  $\mu$ M), o inibidor de MEK 1/2 (PD98059, 10  $\mu$ M) e inibidor de CaMK-2 (KN-93, 1  $\mu$ M) bloquearam o efeito protetor da creatina frente a toxicidade proporcionada pela 6-OHDA em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Figura 47A-E, respectivamente). Os inibidores de cinase por si só não exerceram qualquer ação significativa sobre a morte celular causada por 6-OHDA.



**Figura 48. Envolvimento de PKA, PKC, MEK 1/2 e PI3K/AKT no efeito protetor da creatina na morte celular induzida por 6-OHDA.** As células foram pré-incubadas com 0,1 μM de queleritrina (inibidor de PKC, Painei A), 1 μM de KN-93 (inibidor de CaMK-2, Painei B), 10 μM de LY294002 (inibidor de PI3K, Painei C), 2 μM H-89 (inibidor de PKA, Painei D) e 10 μM de PD98059 (MEK1 / 2 inibidor, Painei E) 1 h antes do tratamento com creatina. Os inibidores estavam presentes durante todo o período de incubação com creatina. O efeito protetor da creatina sobre a toxicidade induzida por 6-OHDA foi prevenido por todos os cinco inibidores de cinases. Os dados são representados como média + SEM de 7-9 determinações experimentais. \*P<0,05 ou \*\*P<0,01 ou \*\*\*P<0,001 em relação ao grupo controle; ##P<0,01 ou ###P<0,001 em comparação com o grupo incubado com 100 μM de 6-OHDA. \$P<0,05 ou \$\$P<0,01 ou \$\$\$P<0,001 quando comparado com o grupo incubado com 100 μM de 6-OHDA e creatina 10 μM.

### 5.3.1. Discussão

Para obtermos informações sobre as vias de sinalização intracelular implicadas no efeito protetor da creatina, postulamos que diferentes cinases poderiam estar participando de tal efeito. A primeira que estudamos foi a PI3K, uma cinase chave implicada na proliferação, crescimento, sobrevivência celular, aprendizagem e memória (DWIVEDI, JANICAK e PANDEY, 1998; KELLY e LYNCH, 2000; HUANG, VERKHRATSKY e FERNYHOUGH, 2005). Produtos lipídicos da PI3K atuam como segundos mensageiros por recrutar e ativar algumas cinases, como a AKT (HANADA, FENG e HEMMING, 2004). Além disso, estudos recentes têm relatado que a via de sinalização da PI3K/AKT desempenha um papel importante no efeito neuroprotetor de vários compostos sobre a morte celular induzida por 6-OHDA (HWANG e JEONG, 2008; KAO, SHYU e YEN, 2009; HWANG e JEONG, 2010; MNICH *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2012). Os resultados apresentados em nosso estudo também indicam que a exposição de células SH-SY5Y ao LY294002, um inibidor de PI3K, suprimiu o efeito protetor da creatina em células expostas a 6-OHDA. Além disso, alguns estudos mostraram que LY294002 reprime a expressão gênica da enzima creatina cinase muscular, o que sugere o papel importante da via de sinalização mediada por PI3K/AKT no metabolismo da creatina (JIANG, ZHENG e VOGT, 1998). De acordo com nossos resultados, um estudo demonstrou que a incubação com creatina aumentou a fosforilação de AKT e de proteínas alvo, tais como a GSK-3 $\beta$  e p70S6K, em células C2C12 (DELDICQUE *et al.*, 2007).

Verificamos também que H-89 suprimiu a proteção da creatina contra a toxicidade induzida por 6-OHDA. H-89 atua como um inibidor competitivo da ligação de ATP à subunidade catalítica da PKA (CHIJIWA *et al.*, 1990), uma enzima envolvida na síntese e liberação de neurotransmissores, expressão gênica, plasticidade sináptica, memória, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. O principal mecanismo de PKA é a fosforilação de substratos específicos, que incluem o elemento de ligação ao fator responsivo ao AMP cíclico (CREB) (D'SA e DUMAN, 2002; GOULD e MANJI, 2002; BLENDY, 2006). A fosforilação de CREB promove a expressão de proteínas tais como o BDNF, o qual tem sido implicado na manutenção de neurônios, sobrevivência das células, e plasticidade neuronal (D'SA e DUMAN, 2002). Nossos resultados também indicam pela primeira vez que a exposição de

células SH-SY5Y a H-89 aboliu o efeito protetor da creatina na toxicidade induzida por 6-OHDA, sugerindo que a ativação de PKA está implicada no efeito neuroprotetor da creatina.

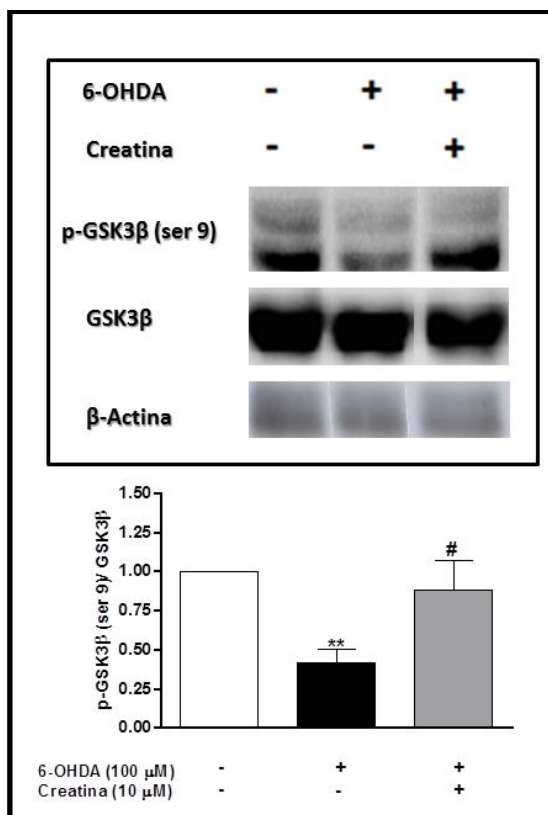
Nossos resultados também indicam que o efeito protetor da creatina contra a morte celular induzida por 6-OHDA é dependente, ao menos em parte, da ativação de PKC, desde que queleritrina foi capaz de abolir o efeito protetor da creatina. De acordo com nossos resultados, estudos têm relatado que a via de sinalização mediada por PKC desempenha um papel importante no efeito protetor de vários compostos sobre a morte celular induzida por 6-OHDA (TIAN *et al.*, 2007; TIONG, LU e BIAN, 2010; QUESADA *et al.*, 2011). A ativação PKC pode proteger os neurônios neonatais da apoptose induzida por privação de soro (BEHRENS *et al.*, 1999). Além disso, éster de forbol, um ativador de PKC, protege cultivos hipocampal e cortical do estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DORE *et al.*, 1999; MAHER, 2001).

PD98059 (um inibidor de MEK1/2) foi capaz de bloquear a ação protetora da creatina contra a morte celular induzida por 6-OHDA. Sabendo que MEK (MAPKK) é o ativador imediato de ERK (LEWIS, SHAPIRO e AHN, 1998), estes resultados sugerem que a via de sinalização mediada por MEK/ERK também participa do efeito protetor da creatina no protocolo de morte celular. Em linha com esta evidência, um estudo demonstrou que a incubação com creatina aumentou a fosforilação de ERK1/2 em células C2C12 (DELDICQUE *et al.*, 2007). Além disso, outro estudo demonstrou uma rápida ativação de ERK1/2 em células SH-SY5Y induzido pelo estresse oxidativo em decorrência do tratamento com 6-OHDA, sugerindo que esta via sirva como uma resposta de autoproteção celular em detrimento da produção de espécies reativas de oxigênio e do aumento da atividade de caspase-3 (LIN *et al.*, 2008).

Além disso, CaMK-2 é a proteína cinase mais abundante no cérebro e está envolvida na plasticidade neuronal (WANG e MALER, 1998; HUDMON e SCHULMAN, 2002). Além disso, a expressão de CaMK-2 encontram-se alterados após a desnervação nigrostriatal (OH, VAUGHAN e CHASE, 1999). Nossos resultados mostram que KN-93 suprimiu o efeito protetor da creatina, o que sugere que esta via de sinalização está envolvida na proteção da creatina neste protocolo de morte celular.

#### 5.4. EFEITO DA CREATINA SOBRE A FOSFORILAÇÃO DE GSK-3 $\beta$ em células SH-SY5Y

Os resultados descritos na Figura 48 mostram que a incubação com 6-OHDA durante 24 h diminuiu a fosforilação de GSK-3 $\beta$  em seu resíduo de serina 9 (59% de redução). Quando a creatina (10  $\mu$ M) foi pré e co-incubada com 6-OHDA, este tratamento bloqueou completamente o efeito desta toxina sobre a fosforilação de GSK-3  $\beta$ .



**Figura 49. Proteção induzida pela creatina contra a toxicidade induzida por 6-OHDA em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y está associada com fosforilação de GSK-3 $\beta$ .** Immunoblotting representativo de P-GSK-3 $\beta$  (Ser9) e GSK-3 $\beta$  total. \*\*P <0,01 quando comparado com o controle. #P <0,05 quando comparado com o grupo incubado com 100  $\mu$ M de 6-OHDA.

#### 5.4.1. Discussão

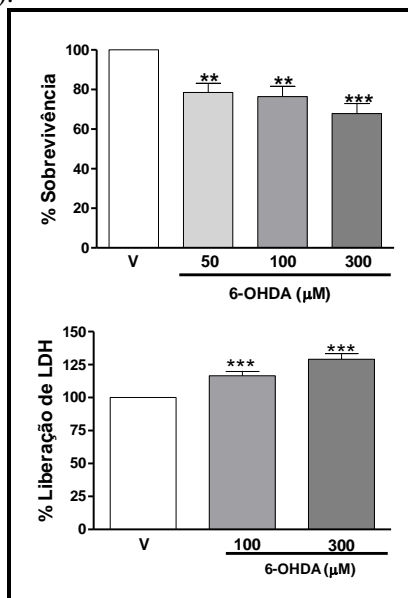
A GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina cinase, originalmente identificada como um regulador de metabolismo do glicogénio, entretanto é agora reconhecida como um importante modulador de processos de apoptose. A atividade de GSK-3 $\beta$  é regulada negativamente pela fosforilação em seu resíduo de serina 9. No presente estudo, demonstramos que a toxina 6-OHDA diminuiu a fosforilação de GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>). Estudos reportam que a 6-OHDA, inibe significativamente a fosforilação de GSK-3 $\beta$  em células SH-SY5Y e PC12 (CHEN *et al.*, 2004). Além disso, células SH-SY5Y *knockdown* para GSK-3 $\beta$  atenuam a apoptose induzida por 6-OHDA (LI e GAO, 2011). Sabe-se que AKT é uma enzima que promove a fosforilação e inativação de GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) e 6-OHDA também inibe a fosforilação de AKT em seu resíduo de serina 473 em células SH-SY5Y e PC12 (CHEN *et al.*, 2004). A fosforilação de GSK-3 pode ser mediada por vários fatores, incluindo as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), AKT (proteína cinase B), algumas isoformas de PKC, proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e de CaMK-2 (ROMMEL *et al.*, 2001; JOPE e ROH, 2006; SONG *et al.*, 2010). Dados da literatura têm relatado que o pré-tratamento com TDZD-8, lítio e L803-mts (inibidores de GSK-3 $\beta$ ) eliminam a morte celular induzida por 6-OHDA (CHEN *et al.*, 2004). No presente estudo, a creatina bloqueou a diminuição na fosforilação de GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) induzida por 6-OHDA. Têm sido descrito que a creatina aumenta a fosforilação de GSK-3 $\beta$  em células C2C12 (DELDICQUE *et al.*, 2007).



## 5.5. EFEITO DE 6-OHDA NA VIABILIDADE DE FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

Examinamos primeiro o efeito de 6-OHDA na viabilidade das fatias de estriado de ratos. Para este fim, as fatias foram incubadas com ou sem 6-OHDA, em concentrações de 50-300  $\mu\text{M}$  durante 4 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT e foi expressa como percentagem de fatias controle, isto é, as fatias incubadas durante 4 h apenas com meio de cultivo (100% de viabilidade celular).

A 6-OHDA, no intervalo de 50-300  $\mu\text{M}$ , diminuiu significativamente a viabilidade celular (a viabilidade celular foi reduzida em 21,4% com 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA, em 23,6% com 100  $\mu\text{M}$  e em 32,2% com 300  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA) (Figura 49A). De acordo com esta redução na viabilidade das células, 6-OHDA aumentou também a liberação de LDH, especialmente nas concentrações de 100 (16,6%) e 300  $\mu\text{M}$  (29,0%), outro forte indicativo de morte celular (Figura 49B).



**Figura 50. Efeito neurotóxico da 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.** A toxina 6-OHDA foi incubada por 4 horas e induziu morte celular em fatias de estriado de ratos, quando a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução de MTT (Painel A) ou por liberação de LDH (Painel B). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  em relação ao grupo controle (V).

### 5.5.1. Discussão

A cultura de fatias de tecido encefálico foi iniciada com base em trabalhos anteriores sobre cultivos de explante de vários tecidos, incluindo o cérebro (CRAIN, 1976), mas teve seu auge apenas em 1981, com a introdução da técnica *roller drum* por GÄHWILER (1981). Esta técnica consiste em colocar o explante sobre uma lâmina e é realizado um coágulo por meio da junção de uma lamínula com plasma de galinha à lâmina de vidro contendo a fatia de tecido. A lâmina é então colocada em um tubo de plástico contendo meio apropriado e este é colocado sobre um equipamento que rotaciona horizontalmente em uma velocidade específica e com um ângulo adequado. Com o tempo o coágulo contendo plasma de galinha que envolve o tecido é progressivamente lisado e as células neuronais crescem em monocamadas. Muitos estudos realizados com esta técnica demonstram que os neurônios cultivados por 2-3 semanas exibem características morfológicas, bem como eletrofisiológicas que são semelhantes às encontradas nas fatias de animais adultos (GÄHWILER, 1984). Em sequência, STOPPINI introduziu a técnica de cultivo de interface (STOPPINI, BUCHS, MULLER, 1991). Nesta técnica o explante é colocado sobre a interface de uma membrana entre o ar e o meio que permite a manutenção do explante. Os resultados obtidos com o método de cultivo de interface são comparáveis àqueles obtidos com a técnica *roller drum*, exceto o aspecto de monocamada das fatias. A partir do surgimento destes métodos, diversos outros procedimentos e metodologias foram propostas e adaptadas. A técnica experimental e o protocolo empregado foram adaptados de MOLZ *et al.* (2009). Este protocolo está bem estabelecido e padronizado em nosso laboratório.

Os doadores de tecido encefálico para as culturas de fatias organotípicas mais utilizados são ratos e camundongos (TETER *et al.*, 1999; WOLF *et al.*, 2001; OLSSOM *et al.*, 2004), mas também coelhos (SAVAS *et al.*, 2001), porcos (MEYER *et al.*, 2000) e fetos humanos (BAUER *et al.*, 2001; WALSH, MEGYESI, HAMMOND, 2005) são utilizados. Em nossos experimentos utilizamos fatias de estriado de ratos pela disponibilidade e facilidade de manipulação destes animais.

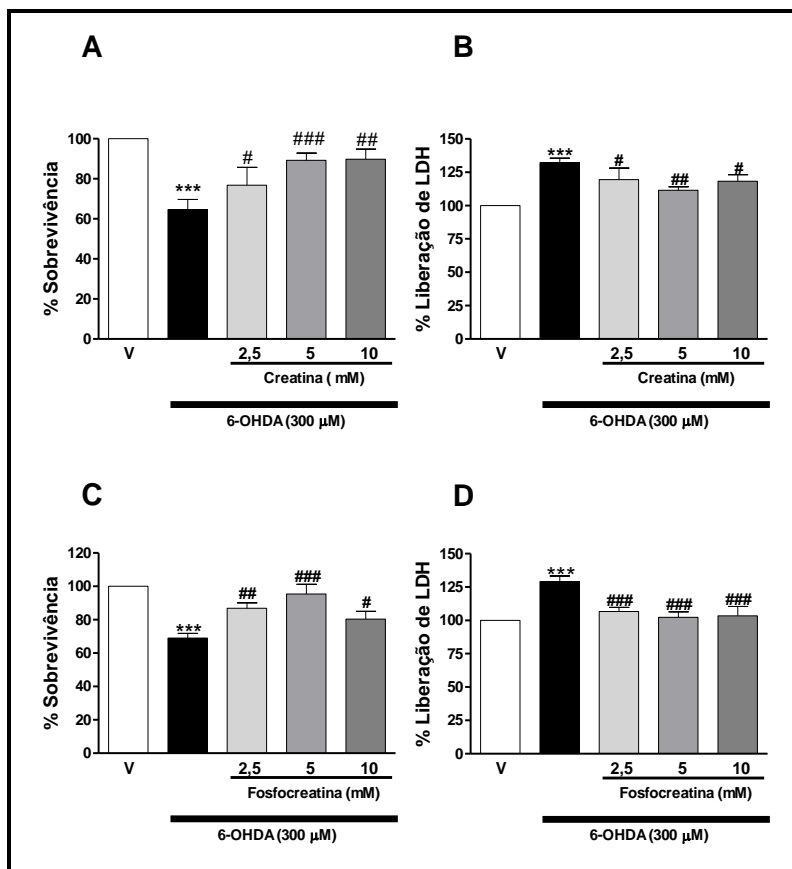
Normalmente as culturas organotípicas de tecidos encefálicos derivam de animais pós-natal jovens (P0-P7), apesar de alguns trabalhos recentes demonstrarem culturas de tecido cerebral de ratos adultos (XIANG *et al.*, 2000; LEUTGEB, FREY,

BEHNISCH, 2003). Também tem sido relatado que os neurônios e células gliais podem sobreviver por semanas em culturas de fatias preparadas a partir de cérebros adultos de humanos (VERWER *et al.*, 2002). Visto o grande número de trabalhos demonstrando a utilização de ratos adultos na preparação de fatias organotípicas, o nosso estudo utilizou fatias de estriado de ratos adultos (90 dias).

Em nossos experimentos, demonstramos que a 6-OHDA é capaz de induzir a morte celular das fatias de estriado de ratos, visto que esta toxina diminuiu a atividade metabólica das células (redução por MTT) e aumentou a permeabilidade da membrana celular (liberação de LDH). Os nossos resultados experimentais em relação à toxicidade da 6-OHDA em fatias de estriado são similares aos resultados encontrados em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Similar aos nossos resultados, a neurotoxina 6-OHDA induz morte neuronal mediada por estresse oxidativo em cultivos de células organotípicas nigroestriatais (SIEBERT *et al.*, 2009), gerando degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos.

## 5.6. EFEITO DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

Avaliamos se a creatina e a fosfocreatina poderiam proteger as fatias de estriado de ratos contra a toxicidade induzida por 6-OHDA, através do método de redução de MTT (Figura 50A e C) e por liberação de LDH (Figura 50B e D). Para este propósito utilizamos o seguinte protocolo experimental: uma co-incubação com 6-OHDA (300  $\mu$ M) e creatina ou fosfocreatina durante 4 h. Quando a creatina ou fosfocreatina (2,5-10 mM) foram co-incubadas com 6-OHDA, estes compostos apresentaram efeito neuroprotetor frente à morte celular induzida por 6-OHDA. Creatina ou fosfocreatina reverteram à diminuição da viabilidade, quando analisada por redução de MTT (Figura 50A e C, respectivamente) ou liberação de LDH (Figura 50B e D, respectivamente).



**Figura 51. Efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina na morte celular em fatias de estriado de ratos induzida por 6-OHDA.** A co-incubação (4 h durante a incubação com 6-OHDA) das fatias de estriado de ratos com creatina ou fosfocreatina (2,5-10 mM) reverteu a diminuição da viabilidade celular, em comparação com o grupo incubado apenas com 6-OHDA. Para analisar a viabilidade das fatias de estriado, estas foram analisadas por redução de MTT (Pânéis A e C) ou por liberação de LDH (Pânéis B e D). Os dados são apresentados como média + SEM de 6-10 passes celulares diferentes e independentes. \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao grupo controle; ##  $P < 0,01$  ou ###  $P < 0,001$  em comparação com o grupo incubado com 100 μM de 6-OHDA.

### 5.6.1. Discussão

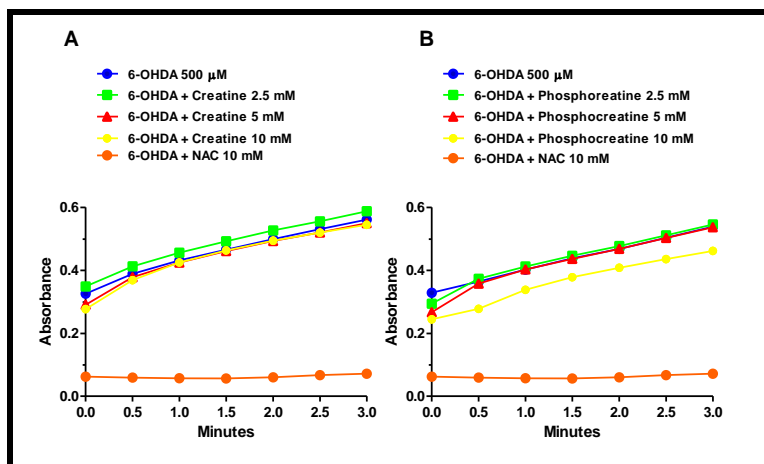
Devido às deficiências na bioenergética cerebral que foram relatadas na DP, nos hipotetizamos que o sistema que regula esse acoplamento entre a síntese de ATP e a utilização do mesmo através da creatina cinase/fosfocreatina possa ter um papel neuroprotetor em tal patologia. De fato, um estudo demonstrou que a administração por via oral de creatina resultou em uma proteção significativa contra a diminuição dos níveis de dopamina induzido por MPTP em camundongos (MATTHEWS *et al.*, 1999). Além disso, verificou-se neste mesmo estudo que a suplementação com creatina protegeu contra a perda nas imunomarcações de Nissl e tirosina hidroxilase induzida pela administração de MPTP em neurônios na substância nigra. A suplementação com creatina parece retardar o aumento na escala unificada da DP que ocorre normalmente no prazo de um ano (50% de atraso). Devido a essa constatação, a creatina está agora sob uma investigação mais aprofundada em um ensaio clínico de fase III realizado por investigadores do NET-PD. Este ensaio é um estudo clínico bem controlado com placebo duplo-cego de fase III, que está examinando 1720 pacientes com estágios iniciais da DP, em 51 centros médicos nos Estados Unidos e Canadá. Nossos experimentos estão de acordo com os dados clínicos e demonstraram que a creatina e a fosfocreatina reverteram a diminuição na viabilidade celular induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos. Esses dados reforçam o papel neuroprotetor da creatina na toxicidade induzida por 6-OHDA, visto que o mesmo evento foi demonstrado em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Um outro estudo também demonstrou que a incubação com creatina em células SH-SY5Y apresentou efeito neuroprotetor na toxicidade induzida por diversas toxinas como hidróclorato de dopamina e rotenona (YONG-KEE, SALOMONCZYK e NASH, 2011). Assim, postulamos que o aumento dos níveis de creatina e fosfocreatina no estriado cerebral de ratos possa ser uma etapa extremamente importante para impedir a progressão da DP. Além disso, pelos nossos resultados acreditamos ainda que a interconversão de creatina em fosfocreatina pela atividade da enzima creatina cinase mitocondrial possa ser uma etapa limitante no efeito neuroprotetor da creatina. Entretanto, dados na literatura demonstraram que camundongos deficientes da

enzima creatina cinase mitocondrial quando administrados com creatina apresentaram efeito neuroprotetor em relação a toxicidade induzida por MPTP e aumentaram os níveis de fosfocreatina (KLIVENYI *et al.*, 2004). Não podemos descartar que o efeito neuroprotetor observado com a fosfocreatina possa ser devido a uma interconversão desta em creatina. Futuros estudos investigando o papel da enzima creatina cinase mitocondrial e citosólica serão de extrema importância para compreendermos o papel deste sistema na fisiopatologia e tratamento da DP.

É válido ressaltar que a creatina em estudos clínicos e pré-clínicos apresenta efeito antidepressivo (ALLEN *et al.*, 2010; LYOO *et al.*, 2012). Sabe-se que compostos antidepressivos, como fluoxetina e desipramina, apresentam efeito neuroprotetor em relação à morte neuronal induzida por 6-OHDA em células mesencefálicas (LIN *et al.*, 2012). Dessa maneira acreditamos que possa existir uma modulação de aspectos moleculares comuns no efeito antidepressivo e neuroprotetor da creatina.

### 5.7. EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

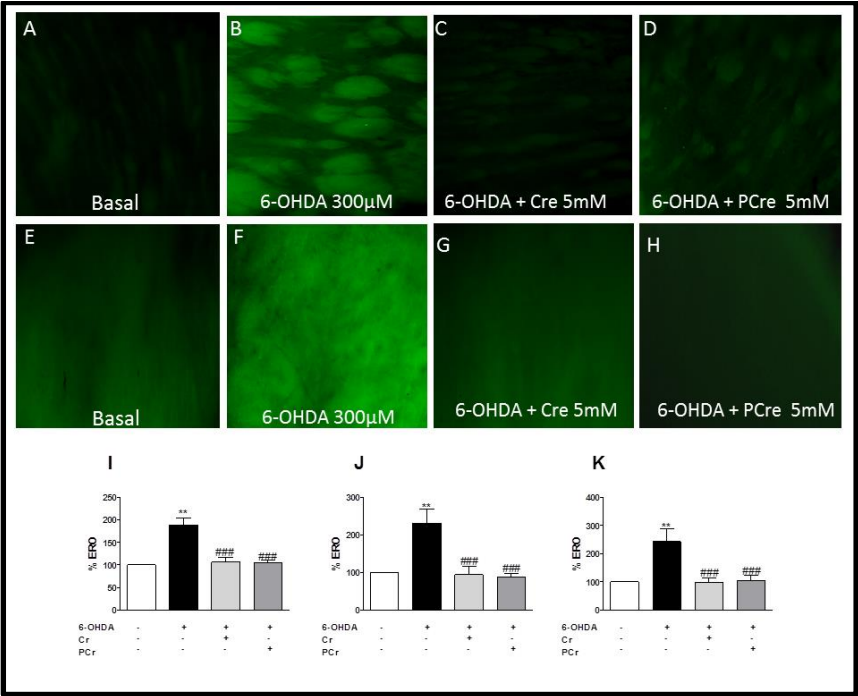
Avaliamos se a creatina e a fosfocreatina poderiam proteger da autooxidação de 6-OHDA. Para este experimento creatina ou fosfocreatina ou N-Acetil-Cisteína (NAC) foram incubados em meios acelulares e foi verificado a colorimetria ao longo de 3 minutos. Nem creatina (Figura 51A) e nem a fosfocreatina (Figura 51B) reduziram a autooxidação de 6-OHDA. NAC (controle positivo) preveniu completamente a autooxidação da 6-OHDA.



**Figura 52. Investigação do efeito da creatina e da fosfocreatina na autooxidação de 6-OHDA.** Nem creatina e nem fosfocreatina impediram a autooxidação de 6-OHDA em um modelo experimental acelular (Painel A e B, respectivamente). O controle positivo N-Acetil-Cisteína preveniu totalmente a autooxidação de 6-OHDA



Em nossos experimentos investigamos também se a creatina e fosfocreatina poderiam ter efeito antioxidante em relação à produção de espécies reativas de oxigênio induzida por 6-OHDA em fatias de estriado (Figura 52I). A partir disto, investigamos em quais núcleos do estriado (globo pálido e putâmen) estariam acontecendo o efeito antioxidante da creatina e fosfocreatina no protocolo de citotoxicidade induzida por 6-OHDA. Para este propósito utilizamos o seguinte protocolo experimental: uma co-incubação com 6-OHDA (300  $\mu$ M) e creatina ou fosfocreatina durante 4 h. Quando a creatina ou fosfocreatina (2,5-10 mM) foram co-incubadas com 6-OHDA, estes compostos apresentaram efeito antioxidante frente a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por 6-OHDA. Creatina ou fosfocreatina reverteram o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio induzida por 6-OHDA em homogenatos de fatias de estriado (Figura 50I). Quando analisamos por microscopia de fluorescência, verificamos que creatina ou fosfocreatina reverteram o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio induzida por 6-OHDA no globo pálido (Figura 52K) e no putâmen (Figura 52J) de fatias de estriado de ratos. As Figuras 52A-D, retratam o núcleo putâmen das fatias de estriado de ratos submetidas a distintos tratamentos. Já as Figuras 52E-H retratam o globo pálido das fatias de estriado de ratos submetidas a distintos tratamentos.



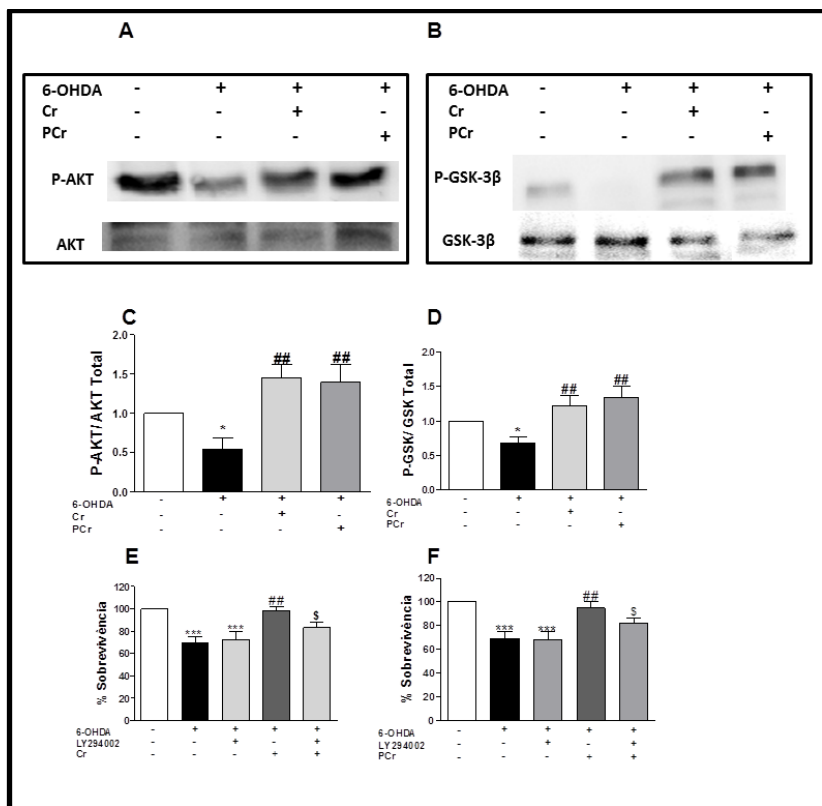
**Figura 53. Efeito antioxidante da creatina e da fosfocreatina em fatias de estriado de ratos expostos à 6-OHDA.** Tratamento com creatina ou fosfocreatina reduziu a produção de ERO no globo pálido e no putâmen do estriado de ratos quando incubadas concomitantemente com a toxina 6-OHDA. ERO foi mensurado por quantificação de fluorescência de DCFDA e analisada em fatias de estriado de ratos sujeitas a 4 horas de incubação com 6-OHDA ou solução controle na ausência ou presença de creatina ou fosfocreatina (5mM). Microfotografias do putâmen (Painéis A-D) ou do globo pálido (Painéis E-H) de fatias de estriado expostas aos distintos tratamentos foram representadas em um aumento de 100x. Na Figura são representados a quantificação das fluorescências das fatias incubadas em condições experimentais, incubadas com 6-OHDA, co-incubadas com 6-OHDA + creatina, e 6-OHDA + fosfocreatina em homogenatos totais de fatias de estriado (Painel I), no putâmen (Painel J) e no globo pálido (Painel K) das fatias de estriado de ratos. Dados correspondem a média e E.P.M. de 6 experimentos. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo basal e ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo incubado com 6-OHDA.

### 5.7.1. Discussão

A toxina 6-OHDA pode induzir a morte de células catecolaminérgicas por três mecanismos principais: espécies reativas de oxigênio geradas por auto-oxidação da toxina no citosol celular, formação de peróxido de hidrogênio intra ou extracelular induzida pela atividade da enzima monoamina oxidase ou inibição direta da cadeia respiratória mitocondrial. Estes acontecimentos conduzem ao estresse oxidativo e uma diminuição na disponibilidade de ATP celular, ambos eventos conduzindo à morte celular (BLUM *et al.*, 2001). Da mesma forma, nos nossos experimentos quando as fatias de estriado foram incubadas com 6-OHDA, a produção de ERO foi elevada. Nossos resultados mostram também que a creatina ou fosfocreatina protegeram contra o aumento da produção de ERO intracelular induzido por 6-OHDA no globo pálido e no putâmen. A atividade antioxidante da creatina ou fosfocreatina pode ser um mecanismo de ação importante na citoproteção mediada por estes compostos na morte celular induzida por 6-OHDA (SESTILI *et al.*, 2011). Outra neurotoxina dopaminérgica, rotenona, induz ao estresse oxidativo em *Drosophila melanogaster*, já que aumentou a intensidade da fluorescência de DCFDA e creatina reduziu esse efeito (HOSAMANI, RAMESH e MURALIDHARA, 2010). Hosamani et al. (2010) indicou também que as moscas que foram suplementadas com creatina exibiram uma diminuição significativa dos níveis de marcadores oxidativos endógenos, tais como o malondialdeído e hidroperóxidos. Além disso, a diminuição na viabilidade celular induzida por  $H_2O_2$  é revertida pela co-incubação com creatina (SESTILI *et al.*, 2009; SARTINI *et al.*, 2012). Ainda, (LAWLER *et al.*, 2002) relataram um efeito antioxidante direto da creatina em sistemas aquosos acelular contra radicais livres e espécies reativas. No entanto, no presente estudo nem a fosfocreatina, nem a creatina bloquearam a auto-oxidação de 6-OHDA. A partir disto, postulamos que os efeitos neuroprotetores e antioxidante mediado por creatina e fosfocreatina pudessem ser mediados por vias de sinalização intracelular dependente de PI3K/AKT.

## 5.8. ENVOLVIMENTO DE PI3K/AKT NO EFEITO NEUROPROTETOR DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

Avaliamos a fosforilação de duas proteínas chave em processos de apoptose, AKT e GSK-3 $\beta$  (Figura 53A-B). Para este propósito utilizamos o seguinte protocolo experimental: uma co-incubação com 6-OHDA (300  $\mu$ M) e creatina ou fosfocreatina durante 4 h. Quando a creatina ou fosfocreatina (5 mM) foram co-incubadas com 6-OHDA, estes compostos apresentaram reverteram a diminuição na fosforilação de AKT (Ser<sup>473</sup>) e GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) induzida por 6-OHDA (Figuras 53A-B, respectivamente). Além disso, as fatias de estriado foram pré-incubadas com 30  $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) 1 h antes do tratamento com creatina ou fosfocreatina. O inibidor de cinase foi também presente durante todo o período de incubação com 6-OHDA. O efeito protetor da creatina e da fosfocreatina sobre a morte celular induzida por 6-OHDA foi prevenido pelo inibidor da PI3K, quando analisado por redução de MTT (Figuras 53C-D, respectivamente).



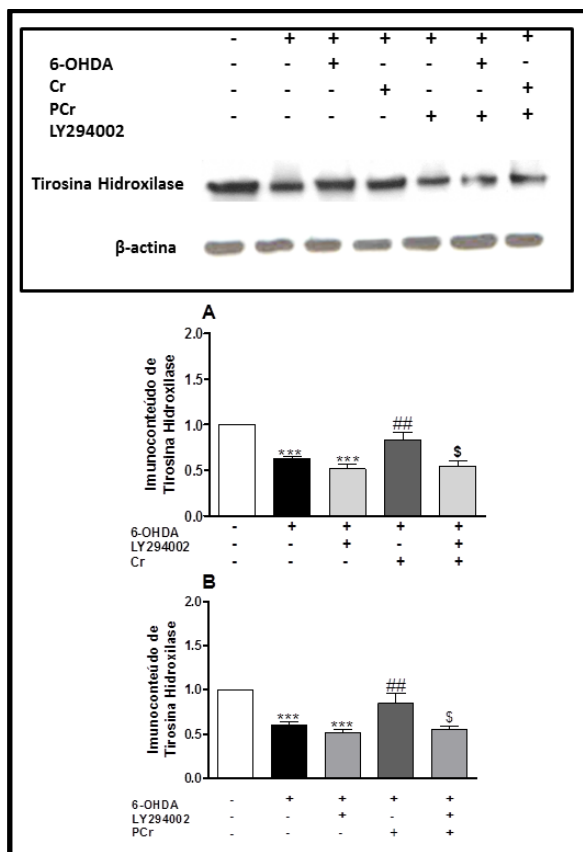
**Figura 54. Envolvimento da PI3K/AKT no efeito neuroprotetor da creatina e da fosfocreatina em relação à toxicidade induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.** A incubação com creatina ou fosfocreatina reverteu a diminuição na fosforilação de AKT (Ser<sup>473</sup>) e GSK-3β (Ser<sup>9</sup>) induzida pela 6-OHDA (Painel A e B, respectivamente). As fatias de estriado foram pré-incubadas com 30 μM de LY294002 (inibidor de PI3K) 1 h antes do tratamento com creatina ou fosfocreatina. O inibidor de cinase foi também presente durante todo o período de incubação com 6-OHDA. O efeito protetor da creatina e da fosfocreatina sobre a toxicidade induzida por 6-OHDA foi prevenido pelo inibidor da PI3K, quando analisado por redução de MTT (Painéis C e D, respectivamente). Os dados são representados como média + SEM de 7-9 determinações experimentais. \*P<0,05 ou \*\*P<0,01 ou \*\*\*P<0,001 em relação ao grupo controle; ##P<0,01 ou ###P<0,001 em comparação com o grupo incubado com 100 μM de 6-OHDA. §P<0,05 ou §§P<0,01 ou \$\$\$P<0,001 quando comparado com o grupo incubado com 100 μM de 6-OHDA + creatina 5 mM.

### 5.8.1. Discussão

Para obter informações sobre as vias de sinalização intracelulares supostamente envolvidas no efeito neuroprotetor e antioxidante da creatina, analisamos se a ativação da via de sinalização intracelular mediada por PI3K, AKT e GSK-3 $\beta$  está envolvida em tais efeitos. PI3K é uma cinase chave implicada em diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, crescimento, sobrevivência e aprendizagem e memória (DWIVEDI, JANICAK e PANDEY, 1998; KELLY e LYNCH, 2000; HUANG, VERKHRATSKY e FERNYHOUGH, 2005; YANG *et al.*, 2008). Produtos lipídicos da PI3K atuam como segundos mensageiros, pois recrutam proteínas cinases como AKT (HANADA, FENG e HEMMINGS, 2004). AKT é inibida por 6-OHDA em SH-SY5Y e células PC12 (CHEN *et al.*, 2004). Além disso, estudos recentes relataram que a via de sinalização de PI3K/AKT apresenta um papel importante no efeito neuroprotetor de vários compostos sobre a morte celular induzida por 6-OHDA (HWANG e JEONG, 2008; KAO, SHYU e YEN, 2009; HWANG e JEONG, 2010; MNICH *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2012). Os nossos resultados demonstram que a incubação com 6-OHDA diminui a fosforilação de AKT (Ser<sup>473</sup>) e creatina ou fosfocreatina reverteram completamente este efeito. Em linha com o nosso resultado, um estudo anterior demonstrou que a incubação de creatina aumentou a fosforilação de AKT em células C2C12 (DELDICQUE *et al.*, 2007). Além disso, a suplementação de creatina mais ribose também promoveu um aumento de fosforilação de AKT em cardiomiócitos (CARETTI *et al.*, 2010). Os resultados indicam também que a exposição das fatias de estriado de ratos a LY294002, um inibidor de PI3K, suprimiu o efeito protetor da creatina e fosfocreatina na morte das fatias de estriado de ratos induzida por 6-OHDA. No presente estudo, demonstramos ainda que a 6-OHDA diminuiu a fosforilação de GSK3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) e creatina ou fosfocreatina bloquearam este efeito. Estes dados estão em acordo com nossos resultados anteriores em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y que demonstraram uma diminuição da fosforilação de GSK3 $\beta$  induzida por 6-OHDA e a incubação com creatina preveniu este efeito. Um estudo também relatou que a creatina aumentou a fosforilação de GSK3 $\beta$  em células C2C12 (DELDICQUE *et al.*, 2007).

### 5.9. ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT NO EFEITO DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS DE TIROSINA HIDROXILASE INDUZIDA POR 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

As fatias de estriado foram pré-incubadas com 30  $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) 1 h antes do tratamento com creatina ou fosfocreatina. O inibidor de cinase foi também presente durante todo o período de incubação com 6-OHDA. O efeito da creatina e da fosfocreatina sobre a diminuição do imunoconteúdo de tirosina hidroxilase induzida por 6-OHDA foi prevenido pelo inibidor da PI3K (Figura 54A-B).



**Figura 55. Envolvimento da PI3K/AKT no efeito protetor da creatina e da fosfocreatina contra a redução do imunoc conteúdo de tirosina hidroxilase induzido por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.** A incubação com creatina ou fosfocreatina reverteu a diminuição no imunoc conteúdo de tirosina hidroxilase induzida pela 6-OHDA (Painel A e B, respectivamente). As fatias de estriado foram pré-incubadas com 30  $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) 1 h antes do tratamento com creatina ou fosfocreatina. O inibidor de cinase estava presente durante todo o período de incubação com 6-OHDA. O imunoc conteúdo de tirosina hidroxilase foi mensurado através da relação de densidade óptica entre tirosina hidroxilase/ $\beta$ -actina. Os dados foram normalizados em relação ao grupo controle = 1,0. Os dados são representados como média + SEM de 7-9 ensaios. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ou \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao grupo controle; ## $P < 0,01$  ou ### $P < 0,001$  em comparação com o grupo incubado com 100  $\mu$ M de 6-OHDA. § $P < 0,05$  ou §§ $P < 0,01$  ou §§§ $P < 0,001$  quando comparado com o grupo incubado com 100  $\mu$ M de 6-OHDA + creatina 5 mM.

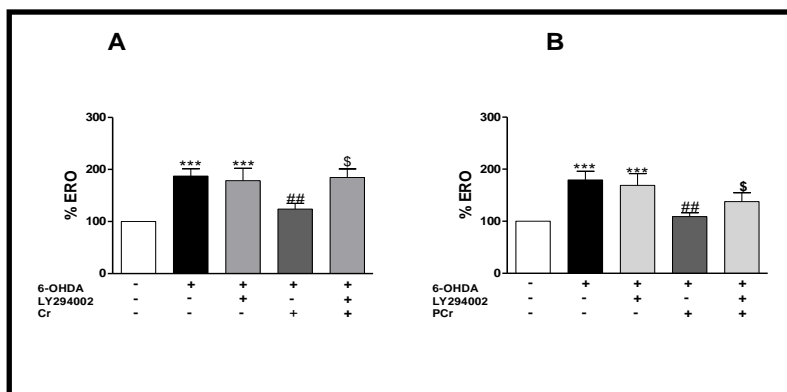


### 5.9.1. Discussão

Reforçando a hipótese de que o efeito protetor da creatina é mediado pela via de sinalização intracelular da PI3K/AKT, no nosso estudo LY294002 bloqueou o efeito neuroprotetor da creatina e fosfocreatina na reversão da diminuição nos níveis de tirosina hidroxilase induzida por 6-OHDA nas fatias de estriado de ratos. Um estudo demonstrou que camundongos deficientes para a enzima creatina cinase mitocondrial apresentaram aumento na sensibilidade ao tratamento com MPTP na depleção de dopamina estriatal e imunomarcção para tirosina hidroxilase na substância nigra (KLIVENYI *et al.*, 2004). Além disso, a creatina em outro estudo foi hábil em aumentar as concentrações de fosfocreatina estriatais e este evento está associado com uma prevenção das diminuições das imunomarcções de tirosina hidroxilase na substância nigra (MATTHEWS *et al.*, 1999).

### 5.10. ENVOLVIMENTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT NO EFEITO ANTIOXIDANTE DA CREATINA E DA FOSFOCREATINA SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR 6-OHDA EM FATIAS DE ESTRIADO DE RATOS

As fatias de estriado foram pré-incubadas com 30  $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) 1 h antes do tratamento com creatina ou fosfocreatina. O inibidor de cinase estava também presente durante todo o período de incubação com 6-OHDA. O efeito da creatina e da fosfocreatina sobre o aumento da produção de ERO induzida por 6-OHDA foi prevenido pelo inibidor da PI3K (Figura 55A-B).



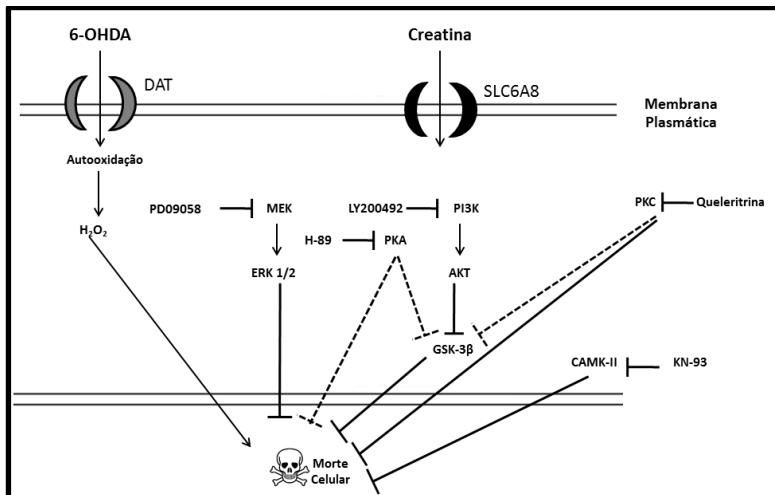
**Figura 56. Envolvimento da PI3K/AKT no efeito antioxidante da creatina e da fosfocreatina sobre a produção de ERO induzida por 6-OHDA em fatias de estriado de ratos.** A incubação com creatina ou fosfocreatina reverteu o aumento na produção de ERO induzida pela 6-OHDA (Painel A e B, respectivamente). As fatias de estriado foram pré-incubadas com 30  $\mu$ M de LY294002 (inibidor de PI3K) 1 h antes do tratamento com creatina ou fosfocreatina. O inibidor de cinase estava presente durante todo o período de incubação com 6-OHDA. Os dados são representados como média + SEM de 7-9 determinações experimentais. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  ou \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao grupo controle; ## $P < 0,01$  ou ### $P < 0,001$  em comparação com o grupo incubado com 100  $\mu$ M de 6-OHDA. \$ $P < 0,05$  ou \$\$ $P < 0,01$  ou \$\$\$ $P < 0,001$  quando comparado com o grupo incubado com 100  $\mu$ M de 6-OHDA + creatina 5 mM.

### **5.10.1. Discussão**

Em nosso estudo, LY294002 bloqueou o efeito neuroprotetor da creatina e fosfocreatina na reversão do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio induzida por 6-OHDA nas fatias de estriado de ratos. Assim, postulamos que a ativação de AKT induzida por creatina ou fosfocreatina possa ser hábil em aumentar a tradução de proteínas antioxidantes, como a enzima antioxidante hemeoxigenase-1, e este evento possa mediar os efeitos da creatina e da fosfocreatina contra os efeitos oxidantes da 6-OHDA. Digno de nota, a ativação de hemeoxigenase-1 parece ser um evento importante no efeito antidepressivo da creatina no TSC.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos dados indicam que creatina e fosfocreatina apresentam efeito neuroprotetor e antioxidante diante da morte celular associada com estresse oxidativo induzida por 6-OHDA. Além disso, postulamos que o efeito neuroprotetor e antioxidante da creatina e da fosfocreatina seja dependente da ativação da via de sinalização intracelular mediada por PI3K/AKT com subsequente inativação de GSK-3 $\beta$ . A possível modulação de cinases intracelulares pelo tratamento com creatina em células dopaminérgicas é mostrada na Figura 56. Esse conjunto de dados nos fornecem subsídios para a compreensão da importância do sistema creatina cinase/fosfocreatina na fisiopatologia e tratamento da DP.



**Figura 57. Modelo experimental do mecanismo de ação intracelular implicado no efeito neuroprotetor da creatina em relação à morte celular induzida por 6-OHDA.** 6-OHDA entra no neurônio dopaminérgico através do transportador de dopamina (DAT) e dentro do mesmo se autooxida e produz espécies reativas de oxigênio (EROs) e processos de morte celular. Creatina entra nos neurônios dopaminérgicos através do transportador de creatina (SLC6A8) e dentro dos mesmos ativa diversas vias de sinalização intracelular mediadas por distintas cinases como MEK 1/2, PKA, PKC, CaMK-2, PI3K/AKT que inibem processos apoptóticos e morte de neurônios dopaminérgicos.

## DISCUSSÃO INTEGRADA

Há algumas décadas estudos buscam compreender os efeitos dos antidepressivos sobre sistemas de neurotransmissores, entretanto trabalhos recentes alteraram o foco de investigação e sugerem que esta classe de fármaco exerce suas principais ações evitando danos neuronais que podem ocorrer no encéfalo de pacientes com transtornos de humor (YOUNG, 2002). Estudos em animais sugerem que os medicamentos antidepressivos e estabilizadores do humor apresentam propriedades neuroprotetoras (YOUNG, 2002). Reforçando esta hipótese, nosso grupo demonstrou que alguns compostos dotados de ação antidepressiva como o ácido fólico e o extrato de *Aloysia gratissima* apresentam efeito neuroprotetor em distintos modelos celulares de toxicidade (BROCARD et al., 2008; BUDNI et al., 2011; ZENI et al., 2011). No presente trabalho verificamos que a creatina pode ser um importante agente com propriedades antidepressiva e neuroprotetora, sugerindo que este composto tipo-guanidina poderia evitar o dano celular em algumas regiões neuronais acometidas na fisiopatologia da depressão.

Como a depressão parece coexistir com diversas doenças associadas com progressiva morte de populações específicas de neurônios dopaminérgicos, como a DP (MENZA *et al.*, 2009), investigamos se a creatina apresenta efeito neuroprotetor em relação à morte celular induzida pela toxina 6-OHDA, um clássico modelo de toxicidade em células dopaminérgicas. Sabe-se que diversos antidepressivos como a desipramina e a fluoxetina apresentam propriedades neuroprotetoras em relação ao dano celular induzido por toxinas dopaminérgicas como a 6-OHDA e MPTP/MPP<sup>+</sup> em estudos *in vitro* e *in vivo* (SUZUKI *et al.*, 2010; CHUNG *et al.*, 2011; LESEMANN *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012). Muitos agentes farmacológicos com efeito neuroprotetor em relação à morte celular induzida por 6-OHDA apresentam efeito antidepressivo, como por exemplo a guanosina (OSES *et al.*, 2011; BETTIO *et al.*, 2012; GIULIANI *et al.*, 2012).

A creatina em estudos com células e em fatias organotípicas apresenta efeito protetor em modelos de danos celulares induzidos por toxinas dopaminérgicas (MATTHEWS *et al.*, 1999; ANDRES *et al.*, 2005b,c) e glutamatérgicas (BREWER e WALLIMANN, 2000; JURAVLEVA *et al.*, 2005; GENIUS *et al.*, 2012). É reportado que existe uma grande comunicação entre o sistema glutamatérgico e o sistema dopaminérgico, por exemplo, os receptores NMDA colocalizam com receptores dopaminérgicos em diversas regiões

encefálicas e potencializam a transdução de sinais mediada por receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> (DRAGO *et al.*, 2011). Nossos resultados indicam que o efeito antidepressivo da creatina parece depender de uma modulação do sistema dopaminérgico e glutamatérgico, e assim postulamos que uma interação entre os dois sistemas de neurotransmissão seja de extrema importância tanto no efeito protetor, quanto no efeito antidepressivo da creatina.

Os nossos resultados sugerem que mecanismos moleculares intracelulares similares estão implicados na ação antidepressiva e neuroprotetora da creatina. Esta hipótese baseia-se no fato de que as mesmas vias de sinalização mediadas por cinases intracelulares parecem ser alvos moleculares subsequentes ao tratamento com creatina, tanto nos experimentos *in vivo* (atividade antidepressiva), quanto nos experimentos *in vitro* (atividade neuroprotetora).

Postulamos que a suplementação com creatina possa exercer propriedades benéficas em condições que apresentem disfunções na neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, como a depressão e a DP (D'AQUILA *et al.*, 2000; IVERSEN e IVERSEN, 2007). Estudos futuros aprofundando o efeito da suplementação com creatina em modelos animais que mimetizem a DP e/ou depressão serão realizados para o melhor entendimento da ação protetora da creatina em tais condições.





## PERSPECTIVAS

- Investigação do tratamento repetido com creatina sobre o perfil comportamental e o imunoconteúdo de proteínas pró e anti-apoptótica.
- Avaliação comportamental e bioquímica de modelos experimentais da doença de Parkinson induzidos pelas toxinas MPP<sup>+</sup> e 6-OHDA.
- Avaliação do tratamento repetido com creatina em relação ao comportamento motor, a memória de curto prazo, ansiedade e depressão em modelos experimentais da doença de Parkinson induzidos pelas toxinas MPP<sup>+</sup> e 6-OHDA em camundongos.
- Investigação do efeito neuroprotetor da administração repetida de creatina frente à toxicidade induzida pelo peptídeo  $\beta$ -Amilóide<sub>1-42</sub> em camundongos.
- Avaliação do potencial neuroprotetor da creatina no modelo experimental da doença de Huntington induzido pela toxina 3-NP em camundongos.
- Avaliação do efeito neuroprotetor da creatina no modelo experimental de esclerose múltipla em camundongos.
- Investigação do efeito neuroprotetor da creatina frente à toxicidade induzida por glutamato em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y: Envolvimento das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio.
- Avaliação de modelos experimentais de depressão induzidos pelo estresse de contenção e o estresse imprevisível sobre a atividade e a expressão da enzima creatina cinase mitocondrial e citosólica, bem como a expressão do transportador de creatina.
- Avaliação de modelos experimentais de depressão induzidos pelo estresse de contenção e o estresse imprevisível sobre a expressão gênica e o imunoconteúdo de heme oxigenase 1 e Nrf2
- Avaliação de modelos experimentais de depressão induzidos pelo estresse de contenção e estresse imprevisível sobre a expressão gênica e o imunoconteúdo de BDNF, VEGF e FGF-2.



## REFERÊNCIAS

ABELAIRA, H. M. *et al.* . Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochem Int*, v. 59, n. 8, p. 1163-74, 2011.

ABPLANALP, J. *et al.* . The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter. *Hum Mol Genet*, v. 22, n. 16, p. 3218-26.

ABRIAL, E. *et al.* . A role for the PKC signaling system in the pathophysiology and treatment of mood disorders: involvement of a functional imbalance? *Mol Neurobiol*, v. 44, n. 3, p. 407-19, 2011.

ADHINETTY, P. J.; BEAL, M. F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med*, v. 10, n. 4, p. 275-90, 2008.

AGOSTINHO, F. R. *et al.* . Effects of olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine on creatine kinase activity in rat brain. *Brain Res Bull*, v. 80, n. 6, p. 337-40, 2009.

ALBERT, P. R. Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 367, n. 1601, p. 2402-15, 2012.

ALESSI, D. R.; DOWNES, C. P. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta*, v. 1436, n. 1-2, p. 151-64, 1998.

ALLEN, P. J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev*, v. 36, n. 5, p. 1442-62, 2012.

ALLEN, P. J. *et al.* . Chronic creatine supplementation alters depression-like behavior in rodents in a sex-dependent manner. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 2, p. 534-46, 2010.

\_\_\_\_\_. Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 101, n. 4, p. 588-601, 2012.

ALMEIDA-FILHO, N. *et al.* . Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. *Br J Psychiatry*, v. 171, p. 524-9, 1997.

ALMEIDA, L. S. *et al.* . Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse*, v. 60, n. 2, p. 118-23, 2006.

ALMEIDA, R. C. *et al.* . Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behav Brain Res*, v. 168, n. 2, p. 318-22, 2006.

ALT, A. *et al.* . A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem Pharmacol*, v. 71, n. 9, p. 1273-88, 2006.

ALT, A.; WITKIN, J. M.; BLEAKMAN, D. AMPA receptor potentiators as novel antidepressants. *Curr Pharm Des*, v. 11, n. 12, p. 1511-27, 2005.

ALVES, C. R. *et al.* . No effect of creatine supplementation on oxidative stress and cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *J Int Soc Sports Nutr*, v. 9, n. 1, p. 13, 2012.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed., text revision, Washington, DC, 2000.

AMITAL, D. *et al.* . Observed effects of creatine monohydrate in a patient with depression and fibromyalgia. *Am J Psychiatry*, v. 163, n. 10, p. 1840-1, 2006.

ANDJELKOVIC, M. *et al.* . Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, v. 272, n. 50, p. 31515-24, 1997.

ANDREASSEN, O. A. *et al.* . Increases in cortical glutamate concentrations in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice

are attenuated by creatine supplementation. *J Neurochem*, v. 77, n. 2, p. 383-90, 2001.

ANDRES, R. H. *et al.* . Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J Neurochem*, v. 95, n. 1, p. 33-45, 2005a.

ANDRES, R. H. *et al.* . Creatine supplementation improves dopaminergic cell survival and protects against MPP<sup>+</sup> toxicity in an organotypic tissue culture system. *Cell Transplant*, v. 14, n. 8, p. 537-50, 2005b.

ANDRES, R. H. *et al.* . Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull*, v. 76, n. 4, p. 329-43, 2008.

ANDRES, R. H. *et al.* . Effects of creatine treatment on the survival of dopaminergic neurons in cultured fetal ventral mesencephalic tissue. *Neuroscience*, v. 133, n. 3, p. 701-13, 2005c.

ANDREWS, A. M.; MURPHY, D. L. Sustained depletion of cortical and hippocampal serotonin and norepinephrine but not striatal dopamine by 1-methyl-4-(2'-aminophenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine (2'-NH<sub>2</sub>-MPTP): a comparative study with 2'-CH<sub>3</sub>-MPTP and MPTP. *J Neurochem*, v. 60, n. 3, p. 1167-70, 1993.

ARTIGAS, F.; PEREZ, V.; ALVAREZ, E. Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch Gen Psychiatry*, v. 51, n. 3, p. 248-51, 1994.

ARTIGAS, F. *et al.* . Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT<sub>1A</sub> antagonists. *Trends Neurosci*, v. 19, n. 9, p. 378-83, 1996.

ASSIS, L. C. *et al.* . Effect of acute administration of ketamine and imipramine on creatine kinase activity in the brain of rats. *Rev Bras Psiquiatr*, v. 31, n. 3, p. 247-52, 2009.

BIEDLER, J.L.; HELSON, L.; SPENGLER, B.A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, v. 33, n. 11, p. 2643-52, 1973.

BIEDLER, J.L.; ROFFLER-TARLOV, S., SCHACHNER, M.; FREEDMAN, L.S. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, v. 38, n. 11 Pt 1, p. 3751-7, 1978.

BAI, F.; BERGERON, M.; NELSON, D. L. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 44, n. 8, p. 1013-21, 2003.

BAKER, S. K.; TARNOPOLSKY, M. A. Targeting cellular energy production in neurological disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 12, n. 10, p. 1655-79, 2003.

BAKOS, J. *et al.* . Effect of oxytocin on neuroblastoma cell viability and growth. *Cell Mol Neurobiol*, v. 32, n. 5, p. 891-6, 2012.

BALAITA, C. *et al.* . The serum creatine-kinase as a biologic marker in major depression. *Rom J Neurol Psychiatry*, v. 28, n. 2, p. 127-34, 1990.

BALSOM, P. D.; SODERLUND, K.; EKBLUM, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. *Sports Med*, v. 18, n. 4, p. 268-80, 1994.

BARANANO, D. E.; SNYDER, S. H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 20, p. 10996-1002, 2001.

BARBEAU, A. Preliminary observations on abnormal catecholamine metabolism in basal ganglia diseases. *Neurology*, v. 10, p. 446-51, 1960.

BARROS, M. P. *et al.* . Effects of acute creatine supplementation on iron homeostasis and uric acid-based antioxidant capacity of plasma after wingate test. *J Int Soc Sports Nutr*, v. 9, n. 1, p. 25, 2012.

BASSIT, R. A.; CURI, R.; COSTA ROSA, L. F. Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. *Amino Acids*, v. 35, n. 2, p. 425-31, 2008.

BASSIT, R. A. *et al.* . Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *Eur J Appl Physiol*, v. 108, n. 5, p. 945-55, 2010.

BASSON, C. T.; GRACE, A. M.; ROBERTS, R. Enzyme kinetics of a highly purified mitochondrial creatine kinase in comparison with cytosolic forms. *Mol Cell Biochem*, v. 67, n. 2, p. 151-9, 1985.

BAUER, R. M. *et al.* . Coupling of alpha1-adrenoceptors to ERK1/2 in the human prostate. *Urol Int*, v. 86, n. 4, p. 427-33, 2011.

BAUER, M. *et al.* . Liposome-mediated gene transfer to fetal human ventral mesencephalic explant cultures. *Neurosci Lett*, v. 308, n. 3, p. 169-72, 2001.

BAXTER, L. R., JR. *et al.* . Reduction of prefrontal cortex glucose metabolism common to three types of depression. *Arch Gen Psychiatry*, v. 46, n. 3, p. 243-50, 1989.

BEAL, M. F. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 53 Suppl 3, p. S39-47; discussion S47-8, 2003.

BEAULIEU, J. M. *et al.* . Beyond cAMP: The Regulation of Akt and GSK3 by Dopamine Receptors. *Front Mol Neurosci*, v. 4, p. 38, 2011.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 49, p. 327-47, 2009.

BEHRENS, M. M. *et al.* . Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester-induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience*, v. 94, n. 3, p. 917-27, 1999.

BENDER, A. *et al.* . Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. *J Neurol*, v. 252, n. 1, p. 36-41, 2005.

BENDER, A. *et al.* . Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. *Neurology*, v. 67, n. 7, p. 1262-4, 2006.

BENZI, G. Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport? *Pharmacol Res*, v. 41, n. 3, p. 255-64, 2000.

BERGER, M. L. *et al.* . Polyamines and the NMDA receptor: modifying intrinsic activities with aromatic substituents. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 16, n. 11, p. 2837-41, 2006.

BERMAN, R. M. *et al.* . Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, v. 47, n. 4, p. 351-4, 2000.

BERTI, S. L. *et al.* . Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metab Brain Dis*, v. 27, n. 1, p. 79-89, 2012.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BESSMAN, S. P.; GEIGER, P. J. Compartmentation of hexokinase and creatine phosphokinase, cellular regulation, and insulin action. *Curr Top Cell Regul*, v. 16, p. 55-86, 1980.



BESSMAN, S. P. *et al.* . Intimate coupling of creatine phosphokinase and myofibrillar adenosinetriphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 96, n. 3, p. 1414-20, 1980.

BETTIO, L. E. *et al.* . Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behav Brain Res*, v. 234, n. 2, p. 137-48, 2012.

BINDOFF, L. A. *et al.* . Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet*, v. 2, n. 8653, p. 49, 1989.

BINFARE, R. W. *et al.* . Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur J Pharmacol*, v. 638, n. 1-3, p. 78-83, 2010.

BINFARE, R. W. *et al.* . Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 33, n. 3, p. 530-40, 2009.

BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr*, v. 73, p. 787-8, 1961.

BISHOP, A.; ANDERSON, J. E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*, v. 208, n. 2, p. 193-205, 2005.

BLENDY, J. A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1144-50, 2006.

BLESA, J. *et al.* . Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*, v. 2012, p. 845618, 2012.

BLOOM, M. Z. NIH announces phase III clinical trial of creatine for Parkinson's disease. *Consult Pharm*, v. 22, n. 5, p. 378, 2007.

BLUM, D. *et al.* . Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, v. 65, n. 2, p. 135-72, 2001.

BOERO, J. *et al.* . Restricted neuronal expression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase: changing patterns in development and with increased activity. *Mol Cell Biochem*, v. 244, n. 1-2, p. 69-76, 2003.

BONACCORSO, S. *et al.* . Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. *Psychiatry Res*, v. 105, n. 1-2, p. 45-55, 2001.

BONISCH, H.; BRUSS, M. The norepinephrine transporter in physiology and disease. *Handb Exp Pharmacol*, n. 175, p. 485-524, 2006.

BORRELLI, E. *et al.* . Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*, v. 60, n. 6, p. 961-74, 2008.

BOSSONG, F. [In memory of Roland Kuhn (1912-2005) and 50 years of imipramine]. *Nervenarzt*, v. 79, n. 9, p. 1080-6, 2008.

BOTTIGLIERI, T. *et al.* . Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 53, n. 12, p. 1096-8, 1990.

BRAISSANT, O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Inherit Metab Dis*, v. 35, n. 4, p. 655-64, 2012.

BRAISSANT, O. *et al.* . Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol Dis*, v. 37, n. 2, p. 423-33, 2010.

BRAISSANT, O.; HENRY, H. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. *J Inherit Metab Dis*, v. 31, n. 2, p. 230-9, 2008.

BRAISSANT, O. *et al.* . Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 86, n. 1-2, p. 193-201, 2001.

BRAISSANT, O. *et al.* . Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1. *BMC Dev Biol*, v. 5, p. 9, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Assistência psiquiátrica hospitalar: morbidade. Saúde mental em dados, Brasília, v. 1, n. 2, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), FIOCRUZ. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD): Um Panorama da Saúde no Brasil. Acesso e utilização de serviços e fatores de risco e proteção à saúde. 2008.

BRAZIL, D. P.; YANG, Z. Z.; HEMMINGS, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, v. 29, n. 5, p. 233-42, 2004.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, v. 8, n. 1, p. 3-11, 1992.

BREMNER, J. D. *et al.* . Regional brain metabolic correlates of alpha-methylparatyrosine-induced depressive symptoms: implications for the neural circuitry of depression. *JAMA*, v. 289, n. 23, p. 3125-34, 2003.

BREWER, G. J.; WALLIMANN, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem*, v. 74, n. 5, p. 1968-78, 2000.

BROCARDO PDE, S. *et al.* . Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol*, v. 598, n. 1-3, p. 37-42, 2008.

BROCARDO, P. S. *et al.* . Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 2, p. 464-73, 2008.

BROOKS, S. P.; SUELTER, C. H. Association of chicken mitochondrial creatine kinase with the inner mitochondrial membrane. *Arch Biochem Biophys*, v. 253, n. 1, p. 122-32, 1987.

BROWN, A. S.; GERSHON, S. Dopamine and depression. *J Neural Transm Gen Sect*, v. 91, n. 2-3, p. 75-109, 1993.

BRUNELLO, N. *et al.* . The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 12, n. 5, p. 461-75, 2002.

BRUNN, G. J. *et al.* . The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antibodies to a region near its COOH terminus. *J Biol Chem*, v. 272, n. 51, p. 32547-50, 1997a.

BRUNN, G. J. *et al.* . Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, v. 277, n. 5322, p. 99-101, 1997b.

BRUSTOVETSKY, N.; BRUSTOVETSKY, T.; DUBINSKY, J. M. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem*, v. 76, n. 2, p. 425-34, 2001.

BUDA, O. *et al.* . Georges Marinesco and the early research in neuropathology. *Neurology*, v. 72, n. 1, p. 88-91, 2009.

BUDNI, J. *et al.* . Involvement of PI3K, GSK-3 $\beta$  and PPAR $\gamma$  in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol*, v. 26, n. 5, p. 714-23, 2012.

BUDNI, J. *et al.* . Neurotoxicity induced by dexamethasone in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line can be prevented by folic acid. *Neuroscience*, v. 190, p. 346-53, 2011.

BUNNEY, W. E., JR.; DAVIS, J. M. Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry*, v. 13, n. 6, p. 483-94, 1965.

BURIGO, M. *et al.* . Effect of electroconvulsive shock on mitochondrial respiratory chain in rat brain. *Neurochem Res*, v. 31, n. 11, p. 1375-9, 2006.

BURKE, R. E. Inhibition of mitogen-activated protein kinase and stimulation of Akt kinase signaling pathways: Two approaches with therapeutic potential in the treatment of neurodegenerative disease. *Pharmacol Ther*, v. 114, n. 3, p. 261-77, 2007.

CADET, J. L. *et al.* . Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastratial injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res*, v. 476, n. 1, p. 10-5, 1989.

CAIN, D. F.; DAVIES, R. E. Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 8, p. 361-6, 1962.

CALABRESE, V. *et al.* . Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*, v. 8, n. 10, p. 766-75, 2007.

CALDARONE, B. J. *et al.* . High-affinity nicotinic acetylcholine receptors are required for antidepressant effects of

amitriptyline on behavior and hippocampal cell proliferation. *Biol Psychiatry*, v. 56, n. 9, p. 657-64, 2004.

CALDERON-RIVERA, A. *et al.* . Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel  $\alpha(2)\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*, v. 51, n. 1, p. 22-30, 2012.

CAN, A. *et al.* . Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. *Genes Brain Behav*, v. 10, n. 4, p. 434-43, 2011.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, 2002.

CAPRA, J. C. *et al.* . Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *Eur J Pharmacol*, v. 643, n. 2-3, p. 232-8, 2010.

CAPURON, L.; RAVAUD, A.; DANTZER, R. Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *J Clin Oncol*, v. 18, n. 10, p. 2143-51, 2000.

CARBONI, E. *et al.* . Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem*, v. 55, n. 3, p. 1067-70, 1990.

CARDOSO, C. C. *et al.* . Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 33, n. 2, p. 235-42, 2009.

CARETTI, A. *et al.* . Supplementation of creatine and ribose prevents apoptosis and right ventricle hypertrophy in hypoxic hearts. *Curr Pharm Des*, 2013.

CARETTI, A. *et al.* . Supplementation of creatine and ribose prevents apoptosis in ischemic cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, v. 26, n. 6, p. 831-8, 2010.

CARLSSON, A. Detection and assay of dopamine. *Pharmacol Rev*, v. 11, n. 2, Part 2, p. 300-4, 1959a.

\_\_\_\_\_. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev*, v. 11, n. 2, Part 2, p. 490-3, 1959b.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, v. 180, n. 4596, p. 1200, 1957.

CARLSSON, A. *et al.* . On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, v. 127, n. 3296, p. 471, 1958.

CARRASCO, E.; CASPER, D.; WERNER, P. Dopaminergic neurotoxicity by 6-OHDA and MPP+: differential requirement for neuronal cyclooxygenase activity. *J Neurosci Res*, v. 81, n. 1, p. 121-31, 2005.

CARRASCO, E.; WERNER, P.; CASPER, D. Prostaglandin receptor EP2 protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-mediated low oxidative stress. *Neurosci Lett*, v. 441, n. 1, p. 44-9, 2008.

CARREY, N. J. *et al.* . Striatal creatine and glutamate/glutamine in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, v. 17, n. 1, p. 11-7, 2007.

CARRODI, H., FUXE, K. The effects of imipramine on central monoamine neurones. *J Pharm Pharmacol*, v. 20, p. 230-231, 1968.

CARTER, A. J. Many agents that antagonize the NMDA receptor-channel complex in vivo also cause disturbances of motor coordination. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 269, n. 2, p. 573-80, 1994.

CARTER, A. J. *et al.* . Preincubation with creatine enhances levels of creatine phosphate and prevents anoxic damage in rat hippocampal slices. *J Neurochem*, v. 64, n. 6, p. 2691-9, 1995.

CASCADE, E.; KALALI, A. H.; KENNEDY, S. H. Real-World Data on SSRI Antidepressant Side Effects. *Psychiatry (Edmont)*, v. 6, n. 2, p. 16-8, 2009.

CASTREN, E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci*, v. 6, n. 3, p. 241-6, 2005.

CASTREN, E.; VOIKAR, V.; RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*, v. 7, n. 1, p. 18-21, 2007.

CASTRO, A. A. *et al.* . Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, v. 229, n. 1, p. 208-15, 2012.

CEDDIA, R. B.; SWEENEY, G. Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J Physiol*, v. 555, n. Pt 2, p. 409-21, 2004.

CELADA, P. *et al.* . The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci*, v. 29, n. 4, p. 252-65, 2004.

CESANA, R. *et al.* . Mesulergine antagonism towards the fluoxetine anti-immobility effect in the forced swimming test in mice. *J Pharm Pharmacol*, v. 45, n. 5, p. 473-5, 1993.

CHARLTON, B. G. The malaise theory of depression: major depressive disorder is sickness behavior and antidepressants are analgesic. *Med Hypotheses*, v. 54, n. 1, p. 126-30, 2000.

CHAUDHURI, K. R. *et al.* . Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, v. 5, n. 3, p. 235-45, 2006.



CHEN, G. *et al.* . Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J*, v. 18, n. 10, p. 1162-4, 2004.

CHEN, M. J.; RUSSO-NEUSTADT, A. A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 135, n. 1-2, p. 181-93, 2005.

CHENG, A. *et al.* . Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol*, v. 258, n. 2, p. 319-33, 2003.

CHENU, F.; DAILLY, E.; BOURIN, M. Effect of antidepressant drugs on 6-OHDA-treated mice in the FST. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 17, n. 3, p. 187-93, 2007.

CHIJIWA, T. *et al.* . Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, v. 265, n. 9, p. 5267-72, 1990.

CHOI, W. S. *et al.* . Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res*, v. 57, n. 1, p. 86-94, 1999.

CHOI, Y. B.; LIPTON, S. A. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci*, v. 57, n. 11, p. 1535-41, 2000.

CHUNG, Y. C. *et al.* . Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation. *Neuropharmacology*, v. 60, n. 6, p. 963-74, 2011.

CLARK, J. F. Creatine and phosphocreatine: a review of their use in exercise and sport. *J Athl Train*, v. 32, n. 1, p. 45-51, 1997.

\_\_\_\_\_. Creatine: a review of its nutritional applications in sport. *Nutrition*, v. 14, n. 3, p. 322-4, 1998.

COCO, M.; PERCIAVALLE, V. Creatine ingestion effects on oxidative stress in a steady-state test at 75% VO(2max). *J Sports Med Phys Fitness*, v. 52, n. 2, p. 165-9, 2012.

COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 2, n. 10, p. 769-76, 2001.

COHEN, P.; GOEDERT, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, v. 3, n. 6, p. 479-87, 2004.

CONG, Z. X. *et al.* . ERK and PI3K signaling cascades induce Nrf2 activation and regulate cell viability partly through Nrf2 in human glioblastoma cells. *Oncol Rep*, v. 30, n. 2, p. 715-22, 2013.

CONNOR, T. J.; LEONARD, B. E. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci*, v. 62, n. 7, p. 583-606, 1998.

CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 32, n. 2-3, p. 476-509, 2000.

CONTESTABILE, A. *et al.* . Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. *Curr Med Chem*, v. 10, n. 20, p. 2147-74, 2003.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*, v. 113, n. 504, p. 1237-64, 1967.

COPPEN, A. J.; DOOGAN, D. P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. *J Clin Psychiatry*, v. 49 Suppl, p. 4-11, 1988.

CORDÁS TA. Depressão: da bile negra aos neurotransmissores. Uma introdução histórica. São Paulo, Lemos, 2002.

CORDOVA, F. M. *et al.* . Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res*, v. 998, n. 1, p. 65-72, 2004.

COTZIAS, G. C. L-Dopa for Parkinsonism. *N Engl J Med*, v. 278, n. 11, p. 630, 1968.

COTZIAS, G. C.; PAPAVALIOU, P. S.; GELLEN, R. Experimental treatment of parkinsonism with L-Dopa. *Neurology*, v. 18, n. 3, p. 276-7, 1968.

Crain, S. M. *Neurophysiological Studies in Tissue Culture*, Raven Press, 1976.

CROSS, D. A. *et al.* . Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, v. 378, n. 6559, p. 785-9, 1995.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CRYAN, J. F.; O'LEARY, O. F. Neuroscience. A glutamate pathway to faster-acting antidepressants? *Science*, v. 329, n. 5994, p. 913-4, 2010.

CUNHA, M. P. *et al.* . Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, n. 8, p. 1913-20, 2008.

CZECH, B. *et al.* . Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, n. 22, p. 12796-801, 2001.

CZYRAK, A. *et al.* . Antidepressant activity of S-adenosyl-L-methionine in mice and rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, v. 3, n. 1, p. 1-17, 1992.

D'AQUILA, P. S. *et al.* . The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol*, v. 405, n. 1-3, p. 365-73, 2000.

D'AQUILA, P. S. *et al.* . Antidepressant-like effect of selective dopamine D1 receptor agonists in the behavioural despair animal model of depression. *Eur J Pharmacol*, v. 262, n. 1-2, p. 107-11, 1994.

D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord*, v. 4, n. 3, p. 183-94, 2002.

DA SILVA, G. D. *et al.* . Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport*, v. 11, n. 17, p. 3699-702, 2000.

DAGER, S. R. *et al.* . Brain metabolic alterations in medication-free patients with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, v. 61, n. 5, p. 450-8, 2004.

DANTZER, R. *et al.* . Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry*, v. 4, n. 4, p. 328-32, 1999a.

DANTZER, R. *et al.* . Cytokines, stress, and depression. Conclusions and perspectives. *Adv Exp Med Biol*, v. 461, p. 317-29, 1999b.

DANYSZ, W. *et al.* . On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. *Pol J Pharmacol Pharm*, v. 38, n. 3, p. 285-98, 1986.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DAVID, D. J. *et al.* . Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist*, v. 16, n. 5, p. 578-91, 2010.

DE BELLIS, M. D. *et al.* . Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in fluoxetine-treated patients with major depression and in healthy volunteers. *Biol Psychiatry*, v. 33, n. 8-9, p. 636-41, 1993.

DEFALCO, A. J.; DAVIES, R. K. The synthesis of creatine by the brain of the intact rat. *J Neurochem*, v. 7, p. 308-12, 1961.

DELDICQUE, L. *et al.* . Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc*, v. 37, n. 5, p. 731-6, 2005.

DELDICQUE, L. *et al.* . Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 293, n. 4, p. C1263-71, 2007.

DELGADO, P. L. *et al.* . Sequential catecholamine and serotonin depletion in mirtazapine-treated depressed patients. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 5, n. 1, p. 63-6, 2002.

DELLA, F. P. *et al.* . Tianeptine treatment induces antidepressive-like effects and alters BDNF and energy metabolism in the brain of rats. *Behav Brain Res*, v. 233, n. 2, p. 526-35, 2012.

DEMANT, T. W.; RHODES, E. C. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med*, v. 28, n. 1, p. 49-60, 1999.

DEMINICE, R.; JORDAO, A. A. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids*, v. 43, n. 2, p. 709-15, 2012.

DEMINICE, R. *et al.* . Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. *Br J Nutr*, v. 102, n. 1, p. 110-6, 2009.

DEMINICE, R. *et al.* . Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition*, 2013.

DEMINICE, R. *et al.* . Creatine supplementation reduces increased homocysteine concentration induced by acute exercise in rats. *Eur J Appl Physiol*, v. 111, n. 11, p. 2663-70, 2011.

DENG, C. *et al.* . Sulforaphane protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K/Akt-dependent manner. *Mol Med Rep*, v. 5, n. 3, p. 847-51, 2012.

DENNY-BROWN, D. The basal ganglia. *Oxford Neurol Monographs*, Oxford Univ. Press, London, 1962

DI CESARE MANNELLI, L. *et al.* . Antidepressant-like effect of artemin in mice: a mechanism for acetyl-L-carnitine activity on depression. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 218, n. 2, p. 347-56, 2011.

DORE, S. *et al.* . Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 5, p. 2445-50, 1999.

DOS REIS, E. A. *et al.* . Effects of a co-treatment with pyruvate and creatine on dendritic spines in rat hippocampus and posterodorsal medial amygdala in a phenylketonuria animal model. *Metab Brain Dis*, 2013.

DOZE, V. A. *et al.* . Long-term alpha1A-adrenergic receptor stimulation improves synaptic plasticity, cognitive function, mood, and longevity. *Mol Pharmacol*, v. 80, n. 4, p. 747-58, 2011.

DOWLATI, Y. *et al.* . A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, v. 67, n. 5, p. 446-57, 2010.

DRAGO, A. *et al.* . The molecular interaction between the glutamatergic, noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems informs a detailed genetic perspective on depressive phenotypes. *Prog Neurobiol*, v. 94, n. 4, p. 418-60, 2011.

DREVETS, W. C. *et al.* . Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 71, n. 3, p. 431-47, 2002.

DU, J. *et al.* . Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 7, n. 3, p. 243-8, 2004.

DUBOVISKY, S.L.; DUBOVISKY, A.N.. Transtornos do humor. *ARTMED*. 2004.

DUCRAY, A. *et al.* . Creatine and neurotrophin-4/5 promote survival of nitric oxide synthase-expressing interneurons in striatal cultures. *Neurosci Lett*, v. 395, n. 1, p. 57-62, 2006.

DUDLEY, D. T. *et al.* . A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 17, p. 7686-9, 1995.

DUMAN, R. S. Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biol Psychiatry*, v. 44, n. 5, p. 324-35, 1998.

\_\_\_\_\_. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry*, v. 17 Suppl 3, p. 306-10, 2002.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, v. 54, n. 7, p. 597-606, 1997.

DUMAN, R. S. *et al.* . Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 35-41, 2012.

DUMAN, R. S.; MALBERG, J.; THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, v. 46, n. 9, p. 1181-91, 1999.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci*, v. 35, n. 1, p. 47-56, 2012.

DWIVEDI, Y.; JANICAK, P. G.; PANDEY, G. N. Elevated [3H]inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites and expressed inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein level in platelets of depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 138, n. 1, p. 47-54, 1998.

DYBALA, M. *et al.* . Lack of NMDA-AMPA interaction in antidepressant-like effect of CGP 37849, an antagonist of NMDA receptor, in the forced swim test. *J Neural Transm*, v. 115, n. 11, p. 1519-20, 2008.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr*, v. 38, p. 1236-9, 1960.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 28, n. 3, p. 435-51, 2004.

ESTEVES, F. C.; GALVAN, A. L. Depressão numa contextualização contemporânea. *Aletheia: revista do curso de psicologia*, Canoas, n. 24, p.127-135, 2006.



FAGNI, L. *et al.* . [The role of nitric oxide and superoxides in the neurotoxicity of glutamate]. J Pharm Belg, v. 50, n. 2-3, p. 204-12, 1995.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. NeuroRx, v. 1, n. 1, p. 139-54, 2004.

FALL, P. A. *et al.* . Survival time, mortality, and cause of death in elderly patients with Parkinson's disease: a 9-year follow-up. Mov Disord, v. 18, n. 11, p. 1312-6, 2003.

FAVATA, M. F. *et al.* . Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem, v. 273, n. 29, p. 18623-32, 1998.

FEIER, G. *et al.* . Creatine kinase levels in patients with bipolar disorder: depressive, manic, and euthymic phases. Rev Bras Psiquiatr, v. 33, n. 2, p. 171-5, 2011.

FERREIRA, G.K.; *et al.* . Brain energy metabolism is increased by chronic administration of bupropion. Acta Neuropsychiatrica, v. 24, n. 2, p. 115-121, 2012.

FIMOGNARI, C. *et al.* . Protective effect of creatine against RNA damage. Mutat Res, v. 670, n. 1-2, p. 59-67, 2009.

FORNO, L. S. *et al.* . Astrocytes and Parkinson's disease. Prog Brain Res, v. 94, p. 429-36, 1992.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem J, v. 359, n. Pt 1, p. 1-16, 2001.

FRAME, S.; COHEN, P.; BIONDI, R. M. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. Mol Cell, v. 7, n. 6, p. 1321-7, 2001.

FRANKE, T. F. *et al.* . Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, v. 275, n. 5300, p. 665-8, 1997.

FRANKE, T. F. *et al.* . The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, v. 81, n. 5, p. 727-36, 1995.

FREITAS, A. E. *et al.* . Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 34, n. 2, p. 335-43, 2010.

FUMAGALLI, F. *et al.* . Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J Neurochem*, v. 93, n. 6, p. 1551-60, 2005.

FUNCHAL, C. *et al.* . Creatine and antioxidant treatment prevent the inhibition of creatine kinase activity and the morphological alterations of C6 glioma cells induced by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Cell Mol Neurobiol*, v. 26, n. 1, p. 67-79, 2006.

GABBAY, V. *et al.* . Lateralized caudate metabolic abnormalities in adolescent major depressive disorder: a proton MR spectroscopy study. *Am J Psychiatry*, v. 164, n. 12, p. 1881-9, 2007.

GÄHWILER, B.H. *et al.* . Organotypic slices cultures: A technique has come of age. *Trends Neurosci.*, v.20, p.471-477, 1997.

GAHWILER, B. H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, v. 4, n. 4, p. 329-42, 1981.

GAMBARANA, C. *et al.* . Crucial role of D<sub>1</sub> dopamine receptors in mediating the antidepressant effect of imipramine. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 50, n. 2, p. 147-51, 1995.

GARCIA-DELGADO, M. *et al.* . Creatine transport in brush-border membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *J Am Soc Nephrol*, v. 12, n. 9, p. 1819-25, 2001.

GARDNER, A. *et al.* . Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord*, v. 76, n. 1-3, p. 55-68, 2003a.

GARDNER, A. *et al.* . Alterations of rCBF and mitochondrial dysfunction in major depressive disorder: a case report. *Acta Psychiatr Scand*, v. 107, n. 3, p. 233-9, 2003b.

GELB, D. J.; OLIVER, E.; GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, v. 56, n. 1, p. 33-9, 1999.

GENIUS, J. *et al.* . Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e30554, 2012.

GIORDANO, S. *et al.* . Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e44610, 2012.

GIULIANI, P. *et al.* . Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. *Panminerva Med*, v. 54, n. 1 Suppl 4, p. 43-51, 2012.

GLINKA, Y.; TIPTON, K. F.; YODIM, M. B. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem*, v. 66, n. 5, p. 2004-10, 1996.

GOETZ, C. G. Jean-Martin Charcot and the aging brain. *Arch Neurol*, v. 59, n. 11, p. 1821-4, 2002.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry*, v. 7, n. 3, p. 254-75, 2002.

GONÇALES, C.A.V.; MACHADO, A.L. Depressão, o mal do século: de que século? *Revista Enfermagem da UERJ*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 298-304, 2007.

GOULD, T. D. *et al.* . AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 7, n. 4, p. 387-90, 2004.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res*, v. 53, n. 2, p. 687-97, 2002.

GOULD, T. D.; ZARATE, C. A.; MANJI, H. K. Glycogen synthase kinase-3: a target for novel bipolar disorder treatments. *J Clin Psychiatry*, v. 65, n. 1, p. 10-21, 2004.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 50, p. 323-54, 2010.

GRAHAM, A. S.; HATTON, R. C. Creatine: a review of efficacy and safety. *J Am Pharm Assoc (Wash)*, v. 39, n. 6, p. 803-10; quiz 875-7, 1999.

GREENAMYRE, J. T.; BETARBET, R.; SHERER, T. B. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 9 Suppl 2, p. S59-64, 2003.

GREENHAFF, P. L. Creatine supplementation: recent developments. *Br J Sports Med*, v. 30, n. 4, p. 276-7, 1996.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Prog Neurobiol*, v. 65, n. 4, p. 391-426, 2001.

GROSS, M.; WALLIMANN, T. Kinetics of assembly and dissociation of the mitochondrial creatine kinase octamer. A fluorescence study. *Biochemistry*, v. 32, n. 50, p. 13933-40, 1993.

GRUBER, S. *et al.* . Quantification of metabolic differences in the frontal brain of depressive patients and controls obtained by <sup>1</sup>H-MRS at 3 Tesla. *Invest Radiol*, v. 38, n. 7, p. 403-8, 2003.

GUALANO, B. *et al.* . Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*, v. 38, n. 1, p. 31-44, 2010.

GUDBJARNASON, S.; MATHES, P.; RAVENS, K. G. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol*, v. 1, n. 3, p. 325-39, 1970.

GUERRERO-ONTIVEROS, M. L.; WALLIMANN, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*, v. 184, n. 1-2, p. 427-37, 1998.

GUIDI, C. *et al.* . Differential effect of creatine on oxidatively-injured mitochondrial and nuclear DNA. *Biochim Biophys Acta*, v. 1780, n. 1, p. 16-26, 2008.

GUIMARAES-FERREIRA, L. *et al.* . Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, v. 112, n. 11, p. 3905-11, 2012.

GUIMBAL, C.; KILIMANN, M. W. A creatine transporter cDNA from Torpedo illustrates structure/function relationships in the GABA/noradrenaline transporter family. *J Mol Biol*, v. 241, n. 2, p. 317-24, 1994.

GURGUIS, G. N. *et al.* . Platelet alpha2A-adrenoceptor function in major depression: Gi coupling, effects of imipramine and relationship to treatment outcome. *Psychiatry Res*, v. 89, n. 2, p. 73-95, 1999.

HA, H. C. *et al.* . The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 21, p. 11557-62, 1997.

HAAS, R. H. *et al.* . Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 37, n. 6, p. 714-22, 1995.

HAENISCH, B.; BONISCH, H. Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacol Ther*, v. 129, n. 3, p. 352-68, 2011.

HAJOS, M. *et al.* . The selective norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant reboxetine: pharmacological and clinical profile. *CNS Drug Rev*, v. 10, n. 1, p. 23-44, 2004.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*, v. 193, n. 2, p. 279-90, 2005.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, Whashington, v. 18, p. 385-403, 1934.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. III. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, Washington, v. 22, p. 345-352, 1936.

HALTENHOF, H.; SCHROTER, C. [Depression in Parkinson disease. A literature review]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, v. 62, n. 3, p. 94-101, 1994.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMINGS, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, v. 1697, n. 1-2, p. 3-16, 2004.

HARKIN, A. *et al.* . Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology*, v. 44, n. 5, p. 616-23, 2003.

HARKIN, A. J. *et al.* . Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol*, v. 372, n. 3, p. 207-13, 1999.

HARVEY, B. H. *et al.* . Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues. *Biochem Pharmacol*, v. 80, n. 10, p. 1580-91, 2010.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*, v. 62, n. 11, p. 1310-6, 2007.

HASSLER, R. Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol*, v. 48, p. 387-476, 1938.

HATTINGEN, E. *et al.* . Phosphorus and proton magnetic resonance spectroscopy demonstrates mitochondrial dysfunction in early and advanced Parkinson's disease. *Brain*, v. 132, n. Pt 12, p. 3285-97, 2009.

HE, Y.; JANSSEN, W. G.; MORRISON, J. H. Synaptic coexistence of AMPA and NMDA receptors in the rat hippocampus: a postembedding immunogold study. *J Neurosci Res*, v. 54, n. 4, p. 444-9, 1998.

HEIBERG, I. L.; WEGENER, G.; ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res*, v. 134, n. 1-2, p. 479-84, 2002.

HEIKKILA, R.; COHEN, G. Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science*, v. 172, n. 3989, p. 1257-8, 1971.

HEIKKILA, R. E. *et al.* . Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*, v. 311, n. 5985, p. 467-9, 1984.

HEIKKILA, R. E. *et al.* . Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett*, v. 62, n. 3, p. 389-94, 1985.

HERRING, N. R. *et al.* . Comparison of time-dependent effects of (+)-methamphetamine or forced swim on monoamines, corticosterone, glucose, creatine, and creatinine in rats. *BMC Neurosci*, v. 9, p. 49, 2008.

HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol*, v. 233, p. 250-8, 1994.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 11 Suppl 1, p. S9-S15, 2005.

HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*, v. 33, n. 2, p. 67-75, 2010.

HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*, v. 27, n. 43, p. 11496-500, 2007.



HORNYKIEWICZ, O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev*, v. 18, n. 2, p. 925-64, 1966.

\_\_\_\_\_. L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids*, v. 23, n. 1-3, p. 65-70, 2002.

HOSAMANI, R.; RAMESH, S. R.; MURALIDHARA. Attenuation of rotenone-induced mitochondrial oxidative damage and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* supplemented with creatine. *Neurochem Res*, v. 35, n. 9, p. 1402-12, 2010.

HOYT, K. R. *et al.* Nitric oxide modulates NMDA-induced increases in intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured rat forebrain neurons. *Brain Res*, v. 592, n. 1-2, p. 310-6, 1992.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med*, v. 71, n. 2, p. 171-86, 2009.

HROUDOVA, J.; FISAR, Z. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett*, v. 31, n. 3, p. 336-42, 2010.

HUANG, T. J.; VERKHRATSKY, A.; FERNYHOUGH, P. Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, v. 28, n. 1, p. 42-54, 2005.

HUDMON, A.; SCHULMAN, H. Structure-function of the multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J*, v. 364, n. Pt 3, p. 593-611, 2002.

HUGHES, A. J. *et al.* The dopaminergic response in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 55, n. 11, p. 1009-13, 1992.

HWANG, Y. P.; JEONG, H. G. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 via the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-

hydroxydopamine-derived oxidative stress. *FEBS Lett*, v. 582, n. 17, p. 2655-62, 2008.

\_\_\_\_\_. Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor-related PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 242, n. 1, p. 18-28, 2010.

IBI, M. *et al.* . Depletion of intracellular glutathione increases susceptibility to nitric oxide in mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurochem*, v. 73, n. 4, p. 1696-703, 1999.

IBGE. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Um panorama da saúde no Brasil: acesso e utilização dos serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde, 2008, Rio de Janeiro, 2010.

INAN, S. Y.; YALCIN, I.; AKSU, F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 77, n. 3, p. 457-64, 2004.

INOUE, T. *et al.* . Bromocriptine treatment of tricyclic and heterocyclic antidepressant-resistant depression. *Biol Psychiatry*, v. 40, n. 2, p. 151-3, 1996.

ISHAK, W. W. *et al.* . The role of dopaminergic agents in improving quality of life in major depressive disorder. *Curr Psychiatry Rep*, v. 11, n. 6, p. 503-8, 2009.

IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*, v. 30, n. 5, p. 188-93, 2007.

JACINTO, E. *et al.* . SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, v. 127, n. 1, p. 125-37, 2006.

JACKSON-LEWIS, V.; BLES, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, v. 18 Suppl 1, p. S183-5, 2012.

JACOBS, I. Dietary creatine monohydrate supplementation. *Can J Appl Physiol*, v. 24, n. 6, p. 503-14, 1999.

JACOBUS, W. E.; LEHNINGER, A. L. Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem*, v. 248, n. 13, p. 4803-10, 1973.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 79, n. 4, p. 368-76, 2008.

JAVAI, J. I.; HENDRICKS, K.; DAVIS, J. M. alpha 1-acid glycoprotein involvement in high affinity binding of tricyclic antidepressants to human plasma. *Biochem Pharmacol*, v. 32, n. 7, p. 1149-53, 1983.

JENCK, F. *et al.* . Brain 5-HT<sub>1C</sub> receptors and antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 18, n. 3, p. 563-74, 1994.

JIANG, B. H.; ZHENG, J. Z.; VOGT, P. K. An essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 24, p. 14179-83, 1998.

JOHNSON, W. C. *et al.* . Reactive oxygen and nitrogen intermediates and products from polyamine degradation are Babesiicidal in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, v. 791, p. 136-47, 1996.

JOPE, R. S.; ROH, M. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets*, v. 7, n. 11, p. 1421-34, 2006.

JOURDI, H. *et al.* . Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. *J Neurosci*, v. 29, n. 27, p. 8688-97, 2009.

JUHN, M. S.; TARNOPOLSKY, M. Oral creatine supplementation and athletic performance: a critical review. *Clin J Sport Med*, v. 8, n. 4, p. 286-97, 1998a.

\_\_\_\_\_. Potential side effects of oral creatine supplementation: a critical review. *Clin J Sport Med*, v. 8, n. 4, p. 298-304, 1998b.

JURAVLEVA, E. *et al.* . Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glial cells, modulates Ras/NF-kappaB signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci Res*, v. 79, n. 1-2, p. 224-30, 2005.

JURAVLEVA E, *et al.* Creatine prevents the cytotoxicity of haloperidol by alteration of NO/Ras/NF- $\kappa$ B system. In: Kekelidze T, Holtzman D, editors. *Creatine kinase and brain energy metabolism: function and disease*. NATO Science Series: Life and Behavioral Science. Amsterdam, IOS Press, V. 343, p. 113-119, 2003.

KAEHLER, S. T. *et al.* . Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res*, v. 835, n. 2, p. 346-9, 1999.

KAIDANOVICH-BEILIN, O. *et al.* . Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on beta-catenin in mouse hippocampus. *Biol Psychiatry*, v. 55, n. 8, p. 781-4, 2004.

KAKU, K. *et al.* . Elevation of striatal interleukin-6 and serum corticosterone contents in MPTP-treated mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 26, n. 9, p. 680-3, 1999.

KALDIS, P. *et al.* . Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Cell Sci*, v. 109 ( Pt 8), p. 2079-88, 1996.

KANASHIRO, C. A.; KHALIL, R. A. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 25, n. 12, p. 974-85, 1998.

KAO, T. C.; SHYU, M. H.; YEN, G. C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway. *J Agric Food Chem*, v. 57, n. 2, p. 754-61, 2009.

KAREGE, F. *et al.* . Alterations in phosphatidylinositol 3-kinase activity and PTEN phosphatase in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuropsychobiology*, v. 63, n. 4, p. 224-31, 2011.

KASPER, S.; EL GIAMAL, N.; HILGER, E. Reboxetine: the first selective noradrenaline re-uptake inhibitor. *Expert Opin Pharmacother*, v. 1, n. 4, p. 771-82, 2000.

KASTER, M. P. *et al.* . Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*, v. 565, n. 1-3, p. 119-24, 2007.

KASTER, M. P. *et al.* . Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 419-26, 2012.

KASTER, M. P.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Involvement of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull*, v. 67, n. 1-2, p. 53-61, 2005.

KATO, T. *et al.* . Brain phosphorous metabolism in depressive disorders detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord*, v. 26, n. 4, p. 223-30, 1992.

KATO, T. *et al.* . Reduction of brain phosphocreatine in bipolar II disorder detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord*, v. 31, n. 2, p. 125-33, 1994.

KATSO, R. *et al.* . Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 17, p. 615-75, 2001.

KATSUOKA, F. *et al.* . Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. J Biol Chem, v. 280, n. 6, p. 4483-90, 2005.

KELLY, A.; LYNCH, M. A. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. Neuropharmacology, v. 39, n. 4, p. 643-51, 2000.

KELLY, J. J. *et al.* . The nitric oxide system and cortisol-induced hypertension in humans. Clin Exp Pharmacol Physiol, v. 25, n. 11, p. 945-6, 1998.

KENNEDY, S. H. *et al.* . Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. Am J Psychiatry, v. 158, n. 6, p. 899-905, 2001.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 47, p. 89-116, 2007.

KERWIN, J. F., JR.; LANCASTER, J. R., JR.; FELDMAN, P. L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. J Med Chem, v. 38, n. 22, p. 4343-62, 1995.

KHANNA, N. K.; MADAN, B. R. Studies on the anti-inflammatory activity of creatine. Arch Int Pharmacodyn Ther, v. 231, n. 2, p. 340-50, 1978.

KHANNA, N. K.; TAHASHILDAR, J. Anti-inflammatory activity of creatine and indomethacin drug mixture in rats. Indian J Exp Biol, v. 23, n. 7, p. 402-3, 1985.

KHARAZIA, V. N. *et al.* . EM colocalization of AMPA and NMDA receptor subunits at synapses in rat cerebral cortex. Neurosci Lett, v. 210, n. 1, p. 37-40, 1996.

KHAZAAL *et al.* . Prise de poids et antipsychotiques: investigation et traitement de la restriction cognitive. Etude préliminaire. J Théor Comport Cogn, v. 15, p. 22-26.

KIM, S. Y. *et al.* . Desipramine attenuates forced swim test-induced behavioral and neurochemical alterations in mice: an in vivo(1)H-MRS study at 9.4T. Brain Res, v. 1348, p. 105-13, 2010.

KINGSLEY, M. *et al.* . Role of creatine supplementation on exercise-induced cardiovascular function and oxidative stress. Oxid Med Cell Longev, v. 2, n. 4, p. 247-54, 2009.

KITADA, Y. *et al.* . Involvement of alpha- and beta 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. Neuropharmacology, v. 22, n. 9, p. 1055-60, 1983.

KLIVENYI, P. *et al.* . Neuroprotective mechanisms of creatine occur in the absence of mitochondrial creatine kinase. Neurobiol Dis, v. 15, n. 3, p. 610-7, 2004.

KNOX, D. *et al.* . Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex. Neurosci Lett, v. 480, n. 1, p. 16-20, 2010.

KOLLING, J.; WYSE, A. T. Creatine prevents the inhibition of energy metabolism and lipid peroxidation in rats subjected to GAA administration. Metab Brain Dis, v. 25, n. 3, p. 331-8, 2010.

KONDO, D. G. *et al.* . Open-label adjunctive creatine for female adolescents with SSRI-resistant major depressive disorder: a 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. J Affect Disord, v. 135, n. 1-3, p. 354-61, 2011.

KORGE, P.; BYRD, S. K.; CAMPBELL, K. B. Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase

and Ca(2+)-ATPase. *Eur J Biochem*, v. 213, n. 3, p. 973-80, 1993.

KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev*, v. 26, n. 3, p. 199-288, 1974.

KOTTKE, M.; WALLIMANN, T.; BRDICZKA, D. Dual electron microscopic localization of mitochondrial creatine kinase in brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol*, v. 51, n. 2, p. 105-17, 1994.

KRAEMER, W. J.; VOLEK, J. S. Creatine supplementation. Its role in human performance. *Clin Sports Med*, v. 18, n. 3, p. 651-66, ix, 1999.

KRAUSE, S. M.; JACOBUS, W. E. Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase. *J Biol Chem*, v. 267, n. 4, p. 2480-6, 1992.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KRYZHANOVSKII, G. N.; KRUPINA, N. A.; KUCHERIANU, V. G. [A new model of an experimental depressive syndrome in rats induced by the systemic administration to the animals of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, v. 45, n. 2, p. 377-87, 1995a.

\_\_\_\_\_. [A new model of depressive syndrome in rats caused by administering 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)]. *Biull Eksp Biol Med*, v. 119, n. 2, p. 125-8, 1995b.

KUBY, S. A.; NODA, L.; LARDY, H. A. Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle. *J Biol Chem*, v. 209, n. 1, p. 191-201, 1954.



KUHN, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry*, v. 115, n. 5, p. 459-64, 1958.

KUMAR, R.; AGARWAL, A. K.; SETH, P. K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem*, v. 64, n. 4, p. 1703-7, 1995.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, v. 339, n. 15, p. 1044-53, 1998.

LANGSTON, J. W.; BALLARD, P. A., JR. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*, v. 309, n. 5, p. 310, 1983.

LAWLER, J. M. *et al.* . Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 290, n. 1, p. 47-52, 2002.

LEES, A. J. *et al.* . Ten-year follow-up of three different initial treatments in de-novo PD: a randomized trial. *Neurology*, v. 57, n. 9, p. 1687-94, 2001.

LEHMANN, H. Über die Umesterung des Adenylsauresystems mit Phosphagenen. *Ibid*, v. 286, p. 336-343, 1936.

LEI, S. Z. *et al.* . Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron*, v. 8, n. 6, p. 1087-99, 1992.

LEITE, V. M. M. *et al.* . Depressão e envelhecimento: estudo nos participantes do Programa Universidade Aberta à Terceira Idade. *Revista Brasileira de Saude Materno Infantil*, Recife, v. 6, n.1, p. 31-38, 2006.

LELAND, K. M.; MCDONALD, T. L.; DRESCHER, K. M. Effect of creatine, creatinine, and creatine ethyl ester on TLR expression in macrophages. *Int Immunopharmacol*, v. 11, n. 9, p. 1341-7, 2011.

LENZ, H. *et al.* . The creatine kinase system in human skin: protective effects of creatine against oxidative and UV damage in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, v. 124, n. 2, p. 443-52, 2005.

LESEMANN, A. *et al.* . MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res*, v. 1457, p. 51-69, 2012.

LEVITES, Y. *et al.* . Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem*, v. 277, n. 34, p. 30574-80, 2002.

LEWIS, T. S.; SHAPIRO, P. S.; AHN, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, v. 74, p. 49-139, 1998.

LI, N. *et al.* . mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, v. 329, n. 5994, p. 959-64, 2010.

LI, X. *et al.* . Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). *Neuropharmacology*, v. 40, n. 8, p. 1028-33, 2001.

LI, Y. C.; GAO, W. J. GSK-3 $\beta$  activity and hyperdopamine-dependent behaviors. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 35, n. 3, p. 645-54, 2011.

LICINIO, J.; MASTRONARDI, C.; WONG, M. L. Pharmacogenomics of neuroimmune interactions in human psychiatric disorders. *Exp Physiol*, v. 92, n. 5, p. 807-11, 2007.

LILIENFELD, D. E.; PERL, D. P. Projected neurodegenerative disease mortality in the United States, 1990-2040. *Neuroepidemiology*, v. 12, n. 4, p. 219-28, 1993.

\_\_\_\_\_. Projected neurodegenerative disease mortality among minorities in the United States, 1990-2040. *Neuroepidemiology*, v. 13, n. 4, p. 179-86, 1994.

LIN, E. *et al.* . Rapid activation of ERK by 6-hydroxydopamine promotes survival of dopaminergic cells. *J Neurosci Res*, v. 86, n. 1, p. 108-17, 2008.

LIN, H. Y. *et al.* . Desipramine protects neuronal cell death and induces heme oxygenase-1 expression in Mes23.5 dopaminergic neurons. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e50138, 2012.

LIN, T. A. *et al.* . PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science*, v. 266, n. 5185, p. 653-6, 1994.

LIN, T. A.; LAWRENCE, J. C., JR. Activation of ribosomal protein S6 kinases does not increase glycogen synthesis or glucose transport in rat adipocytes. *J Biol Chem*, v. 269, n. 33, p. 21255-61, 1994.

\_\_\_\_\_. Control of the translational regulators PHAS-I and PHAS-II by insulin and cAMP in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, v. 271, n. 47, p. 30199-204, 1996.

LINAZASORO, G. New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol Sci*, v. 26, n. 8, p. 391-7, 2005.

LIPINSKI, J. F., JR. *et al.* . Adrenoceptors and the pharmacology of affective illness: a unifying theory. *Life Sci*, v. 40, n. 20, p. 1947-63, 1987.

LIPSKAYA, T.; GEIGER, P. J.; BESSMAN, S. P. Compartmentation and metabolic parameters of mitochondrial hexokinase and creatine kinase depend on the rate of oxidative phosphorylation. *Biochem Mol Med*, v. 55, n. 2, p. 81-9, 1995.

LIPSKAYA, T. *et al.* . Studies of the interaction of mitochondrial creatine kinase with the mitochondrial membrane. *Adv Myocardiol*, v. 3, p. 597-611, 1982.

LIPTON, S. A. *et al.* . Redox modulation of the NMDA receptor by NO-related species. *Prog Brain Res*, v. 118, p. 73-82, 1998.

LIU, J. H. *et al.* . Role of AC-cAMP-PKA Cascade in Antidepressant Action of Electroacupuncture Treatment in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2012, p. 932414, 2012.

LOHMAN, K. Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. *Biochemische Zeitschrift*, v.271, p. 264-277, 1934

LOPEZ-RUBALCAVA, C.; LUCKI, I. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 191-9, 2000.

LOUIS, M. *et al.* . Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory factor mRNA in C(2)C(12) cells. *FEBS Lett*, v. 557, n. 1-3, p. 243-7, 2004.

LOWE, M.T. *et al.* . Dissociated expression of mitochondrial and cytosolic creatine kinases in the human brain: a new perspective on the role of creatine in brain energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 33, n. 8, p. 1295-306, 2013.

LUCKI, I. Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs. *J Clin Psychiatry*, v. 52 Suppl, p. 24-31, 1991.

LUDKA, F. K. *et al.* . Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 23, n. 5, p. 400-12, 2013.

LUGENBIEL, P. *et al.* . Creatine transporter expression after antidepressant therapy in rats bred for learned helplessness. *World J Biol Psychiatry*, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 329-33, 2010.

LUO, F. *et al.* . HtrA2/Omi is involved in 6-OHDA-induced endoplasmic reticulum stress in SH-SY5Y cells. *J Mol Neurosci*, v. 47, n. 1, p. 120-7, 2012.

LUSCOMBE, G. P. *et al.* . Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol*, v. 108, n. 3, p. 669-77, 1993.

LYOO, I. K. *et al.* . A randomized, double-blind placebo-controlled trial of oral creatine monohydrate augmentation for enhanced response to a selective serotonin reuptake inhibitor in women with major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, v. 169, n. 9, p. 937-45, 2012.

MACGILLIVRAY, S. *et al.* . Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, v. 326, n. 7397, p. 1014, 2003.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 33, n. 4, p. 642-50, 2009.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol*, v. 587, n. 1-3, p. 163-8, 2008.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 31, n. 2, p. 421-8, 2007.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 103, n. 2, p. 204-11, 2012.

MADRIGAL, J. L. *et al.* . Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 4, p. 420-9, 2001.

MAENG, S. *et al.* . Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry*, v. 63, n. 4, p. 349-52, 2008.

MAES, M. *et al.* . New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology*, v. 20, n. 3, p. 127-50, 2012.

MAGNI, D. V. *et al.* . Creatine decreases convulsions and neurochemical alterations induced by glutaric acid in rats. *Brain Res*, v. 1185, p. 336-45, 2007.

MAHER, P. How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *J Neurosci*, v. 21, n. 9, p. 2929-38, 2001.

MAIRA, S. M.; FURET, P.; STAUFFER, F. Discovery of novel anticancer therapeutics targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Future Med Chem*, v. 1, n. 1, p. 137-55, 2009.

MAJ, J. *et al.* . Pharmacological effects of milnacipran, a new antidepressant, given repeatedly on the alpha1-adrenergic and serotonergic 5-HT<sub>2A</sub> systems. *J Neural Transm*, v. 107, n. 11, p. 1345-59, 2000.

MALBERG, J. E.; BLENDY, J. A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci*, v. 26, n. 12, p. 631-8, 2005.

MALCON, C.; KADDURAH-DAOUK, R.; BEAL, M. F. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res*, v. 860, n. 1-2, p. 195-8, 2000.

MANDEL, S. A.; SAGI, Y.; AMIT, T. Rasagiline promotes regeneration of substantia nigra dopaminergic neurons in post-MPTP-induced Parkinsonism via activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway. *Neurochem Res*, v. 32, n. 10, p. 1694-9, 2007.

MANIER, D. H. *et al.* . Beta-adrenoceptor-linked protein kinase A (PKA) activity in human fibroblasts from normal subjects and from patients with major depression. *Neuropsychopharmacology*, v. 15, n. 6, p. 555-61, 1996.

MANJI, H. K.; CHEN, G. Post-receptor signaling pathways in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Curr Psychiatry Rep*, v. 2, n. 6, p. 479-89, 2000.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, v. 7, n. 5, p. 541-7, 2001.

MANJI, H. K. *et al.* . Signalling pathways in the brain: cellular transduction of mood stabilisation in the treatment of manic-depressive illness. *Aust N Z J Psychiatry*, v. 33 Suppl, p. S65-83, 1999.

MANJI, H. K. *et al.* . Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry*, v. 5, n. 6, p. 578-93, 2000.

MANTOVANI, M. *et al.* . Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett*, v. 343, n. 1, p. 1-4, 2003.

MANZONI, O. *et al.* . Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron*, v. 8, n. 4, p. 653-62, 1992.

MARSH, L. Neuropsychiatric aspects of Parkinson's disease. Psychosomatics, v. 41, n. 1, p. 15-23, 2000.

MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D. *et al.* . Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. Psychoneuroendocrinology, 2013.

MARTIN, D. *et al.* . Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. J Biol Chem, v. 279, n. 10, p. 8919-29, 2004.

MATTHEWS, R. T. *et al.* . Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. Exp Neurol, v. 157, n. 1, p. 142-9, 1999.

MATTHEWS, R. T. *et al.* . Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. J Neurosci, v. 18, n. 1, p. 156-63, 1998.

MATTSON, M. P.; GLEICHMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. Neuron, v. 60, n. 5, p. 748-66, 2008.

MAURER, I. C.; SCHIPPEL, P.; VOLZ, H. P. Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. Bipolar Disord, v. 11, n. 5, p. 515-22, 2009.

MAYBERG, H. S. Frontal lobe dysfunction in secondary depression. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, v. 6, n. 4, p. 428-42, 1994.

MAYBERG, H. S. *et al.* . Paralimbic hypoperfusion in unipolar depression. J Nucl Med, v. 35, n. 6, p. 929-34, 1994.

MAYORGA, A. J. *et al.* . Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-



hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 298, n. 3, p. 1101-7, 2001.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, v. 11, n. 9, p. 379-87, 1990.

MELO, F. H. *et al.* . Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 25, n. 3, p. 362-7, 2011.

MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. [Creatine: the nutritional supplement for exercise - current concepts]. *Arch Latinoam Nutr*, v. 52, n. 2, p. 117-27, 2002.

MENKES, D. B.; AGHAJANIAN, G. K.; GALLAGER, D. W. Chronic antidepressant treatment enhances agonist affinity of brain alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, v. 87, n. 1, p. 35-41, 1983.

MENKES, D. B.; AGHAJANIAN, G. K.; MCCALL, R. B. Chronic antidepressant treatment enhances alpha-adrenergic and serotonergic responses in the facial nucleus. *Life Sci*, v. 27, n. 1, p. 45-55, 1980.

MENTIS, M. J.; DELALOT, D. Depression in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, v. 96, p. 26-41, 2005.

MENZA, M. *et al.* . The impact of treatment of depression on quality of life, disability and relapse in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 24, n. 9, p. 1325-32, 2009.

MERCIER, G. *et al.* . MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. *J Mol Neurosci*, v. 24, n. 2, p. 207-16, 2004.

MEYER, L. E. *et al.* . Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem*, v. 281, n. 49, p. 37361-71, 2006.

MEYER, M. *et al.* . Improved survival of embryonic porcine dopaminergic neurons in coculture with a conditionally immortalized GDNF-producing hippocampal cell line. *Exp Neurol*, v. 164, n. 1, p. 82-93, 2000.

MICHAEL, N. *et al.* . Metabolic changes within the left dorsolateral prefrontal cortex occurring with electroconvulsive therapy in patients with treatment resistant unipolar depression. *Psychol Med*, v. 33, n. 7, p. 1277-84, 2003.

MIKATI, M. A. *et al.* . Effects of creatine and cyclocreatine supplementation on kainate induced injury in pre-pubescent rats. *Brain Inj*, v. 18, n. 12, p. 1229-41, 2004.

MIKOVA, O. *et al.* . Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 11, n. 3, p. 203-8, 2001.

MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol*, v. 500, n. 1-3, p. 371-84, 2004.

MILLER, H. L. *et al.* . Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. *Arch Gen Psychiatry*, v. 53, n. 2, p. 117-28, 1996a.

MILLER, H. L. *et al.* . Effects of alpha-methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients. *Neuropsychopharmacology*, v. 14, n. 3, p. 151-7, 1996b.

MINEMATSU, M.; NAKAJIMA, K. Significant effect of dimethylsulfoniopropionate on Parkinson's disease of senescence-accelerated mice induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v. 54, n. 4, p. 335-8, 2008.

MIRZA, Y. *et al.* . Increased medial thalamic creatine-phosphocreatine found by proton magnetic resonance spectroscopy in children with obsessive-compulsive disorder

versus major depression and healthy controls. *J Child Neurol*, v. 21, n. 2, p. 106-11, 2006.

MNICH, K. *et al.* . Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int J Cell Biol*, v. 2010, p. 818497, 2010.

MOGHADDAM, B. *et al.* . Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*, v. 17, n. 8, p. 2921-7, 1997.

MOLZ, S.; DECKER, H.; DAL-CIM, T.; CREMONEZ, C.; CORDOVA, F.M.; LEAL, R.B.; TASCA, C.I. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res*, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*, v. 38, n. 11, p. 1709-15, 1989.

MOORE, R.G. Improving the treatment of depression in primary care: problems and prospects. *Br J Gen Pract*, v. 47, n. 422, p. 587-90, 1997.

MORENO, D.H.; DIAS, R.S.; MORENO, R.A. Transtornos do Humor in LOUZÁ, MR *et al.* . *Psiquiatria Básica*, 2ª ed., Porto Alegre, Artmed, 2007

MORETTI, A.; GORINI, A.; VILLA, R. F. Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism. *Mol Psychiatry*, v. 8, n. 9, p. 773-85, 2003.

MORETTI, M. *et al.* . Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the

tail suspension test. Behav Brain Res, v. 225, n. 1, p. 328-33, 2011.

MORI, A. *et al.* . Neural mechanisms underlying motor dysfunction as detected by the tail suspension test in MPTP-treated C57BL/6 mice. Neurosci Res, v. 51, n. 3, p. 265-74, 2005.

MORIGUCHI, S.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. J Neurochem, v. 120, n. 4, p. 541-51, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. Int J Sports Med, v. 18, n. 7, p. 491-6, 1997.

MURAMATSU, H. *et al.* . Nrf2 deficiency leads to behavioral, neurochemical and transcriptional changes in mice. Genes Cells, 2013.

NAIR, A.; VAIDYA, V. A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? J Biosci, v. 31, n. 3, p. 423-34, 2006.

NAKANO, M. *et al.* . Fluvoxamine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells. Life Sci, v. 86, n. 9-10, p. 309-14, 2010.

NAKASHIMA, T. *et al.* . Evidence for creatine biosynthesis in Muller glia. Glia, v. 52, n. 1, p. 47-52, 2005.

NARDI, A.E. Questões atuais sobre depressão. 3. ed. rev. e ampl. São Paulo, Lemos, 2006.

NASH, S. R. *et al.* . Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels*, v. 2, n. 2, p. 165-74, 1994.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, v. 6, n. 12, p. 3051-64, 1992.

NELSON, J. C. Augmentation strategies in the treatment of major depressive disorder. Recent findings and current status of augmentation strategies. *CNS Spectr*, v. 12, n. 12 Suppl 22, p. 6-9, 2007.

NEMEROFF, C. B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*, v. 68 Suppl 8, p. 17-25, 2007.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci*, v. 5 Suppl, p. 1068-70, 2002.

NEMETS, B.; LEVINE, J. A pilot dose-finding clinical trial of creatine monohydrate augmentation to SSRIs/SNRIs/NASA antidepressant treatment in major depression. *Int Clin Psychopharmacol*, v. 28, n. 3, p. 127-33, 2013.

NERY, F. G. *et al.* . Normal metabolite levels in the left dorsolateral prefrontal cortex of unmedicated major depressive disorder patients: a single voxel (1)H spectroscopy study. *Psychiatry Res*, v. 174, n. 3, p. 177-83, 2009.

NESTLER, E. J. *et al.* . Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A., JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1151-9, 2006.

NEVE, K. A.; SEAMANS, J. K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*, v. 24, n. 3, p. 165-205, 2004.

NINDS NET-PD INVESTIGATORS. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology*, v. 66, p. 664-671, 2006.

NOLTMANN, E. A.; MAHOWALD, T. A.; KUBY, S. A. Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. II. Amino acid composition of adenosine triphosphate-creatine transphosphorylase. *J Biol Chem*, v. 237, p. 1146-54, 1962.

NOMURA, A. *et al.* . Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol*, v. 139, n. 4, p. 715-20, 2003.

NOWAK, G.; ORDWAY, G. A.; PAUL, I. A. Alterations in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims. *Brain Res*, v. 675, n. 1-2, p. 157-64, 1995.

O'LEARY, O. F. *et al.* . Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 192, n. 3, p. 357-71, 2007.

O'NEILL, M. F.; CONWAY, M. W. Role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 4, p. 391-8, 2001.

O'NEILL, M. J.; WITKIN, J. M. AMPA receptor potentiators: application for depression and Parkinson's disease. *Curr Drug Targets*, v. 8, n. 5, p. 603-20, 2007.

OH, J. D.; VAUGHAN, C. L.; CHASE, T. N. Effect of dopamine denervation and dopamine agonist administration on serine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits. *Brain Res*, v. 821, n. 2, p. 433-42, 1999.

OH, Y. J. *et al.* . Overexpression of Bcl-2 attenuates MPP<sup>+</sup>, but not 6-ODHA, induced cell death in a dopaminergic neuronal cell line. *Neurobiol Dis*, v. 2, n. 3, p. 157-67, 1995.

OHASHI, S. *et al.* . Age-related severity of dopaminergic neurodegeneration to MPTP neurotoxicity causes motor dysfunction in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett*, v. 401, n. 1-2, p. 183-7, 2006.

OLIVEIRA, M. S. *et al.* . The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. *Behav Brain Res*, v. 187, n. 1, p. 200-4, 2008.

OLSSON, T. *et al.* . Deletion of the adenosine A1 receptor gene does not alter neuronal damage following ischaemia in vivo or in vitro. *Eur J Neurosci*, v. 20, n. 5, p. 1197-204, 2004.

ONGUR, D. *et al.* . Creatine abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Res*, v. 172, n. 1, p. 44-8, 2009.

ORJALES, A. *et al.* . New (2-methoxyphenyl)piperazine derivatives as 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands with reduced alpha 1-adrenergic activity. Synthesis and structure-affinity relationships. *J Med Chem*, v. 38, n. 8, p. 1273-7, 1995.

ORSENIGO, M. N. *et al.* . Effects of creatine in a rat intestinal model of ischemia/reperfusion injury. *Eur J Nutr*, v. 51, n. 3, p. 375-84, 2012.

OSSES, J. P. *et al.* . The hydrolysis of striatal adenine- and guanine-based purines in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*, v. 36, n. 2, p. 215-22, 2011.

OSSOLA, B. *et al.* . Minocycline protects SH-SY5Y cells from 6-hydroxydopamine by inhibiting both caspase-dependent and -independent programmed cell death. *J Neurosci Res*, v. 90, n. 3, p. 682-90, 2012.

OZAWA, H.; RASENICK, M. M. Chronic electroconvulsive treatment augments coupling of the GTP-binding protein Gs to the catalytic moiety of adenylyl cyclase in a manner similar to

that seen with chronic antidepressant drugs. *J Neurochem*, v. 56, n. 1, p. 330-8, 1991.

PAEZ-PEREDA, M. New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 29, n. 6, p. 1010-6, 2005.

PAGE, M. E. *et al.* . Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 147, n. 2, p. 162-7, 1999.

PANDEY, G. N. *et al.* . Altered expression and phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in postmortem brain of suicide victims with or without depression. *J Psychiatr Res*, v. 37, n. 5, p. 421-32, 2003.

PANDEY, G. N. *et al.* . Decreased protein kinase C (PKC) in platelets of pediatric bipolar patients: effect of treatment with mood stabilizing drugs. *J Psychiatr Res*, v. 42, n. 2, p. 106-16, 2008.

PAPAKOSTAS, G. I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 16, n. 6, p. 391-402, 2006.

\_\_\_\_\_. Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*, v. 70 Suppl 5, p. 18-22, 2009.

PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. *Can J Neurol Sci*, v. 37, n. 3, p. 313-9, 2010.

PARINI, S. *et al.* . Chronic reboxetine desensitizes terminal but not somatodendritic alpha2-adrenoceptors controlling noradrenaline release in the rat dorsal hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 6, p. 1048-55, 2005.

PARKER, P. J.; MURRAY-RUST, J. PKC at a glance. *J Cell Sci*, v. 117, n. Pt 2, p. 131-2, 2004.



PARKER, W. D., JR.; BOYSON, S. J.; PARKS, J. K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, v. 26, n. 6, p. 719-23, 1989.

PARODI, M. *et al.* . Effects of exogenous creatine on population spike amplitude and on postanoxic hyperexcitability in brain slices. *Brain Res*, v. 963, n. 1-2, p. 197-202, 2003.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1003, p. 250-72, 2003.

PERAL, M.J. *et al.* . Human, rat and chicken small intestinal Na<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> -creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J Physiol*, v. 545, n. Pt 1, p. 133-44, 2002.

PERAL, M.J. *et al.* . Na(+)/Cl(-)/creatine transporter activity and expression in rat brain synaptosomes. *Neuroscience*, v. 165, n. 1, p. 53-60, 2010.

PERCARIO, S. *et al.* . Effects of creatine supplementation on oxidative stress profile of athletes. *J Int Soc Sports Nutr*, v. 9, n. 1, p. 56, 2012.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev*, v. 53, n. 2, p. 161-76, 2001.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A.; HOCHHAUS, G. Pharmacokinetics of the dietary supplement creatine. *Clin Pharmacokinet*, v. 42, n. 6, p. 557-74, 2003.

PERSKY, A. M. *et al.* . Single- and multiple-dose pharmacokinetics of oral creatine. *J Clin Pharmacol*, v. 43, n. 1, p. 29-37, 2003.

PERUMAL, A. S. *et al.* . Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. *Brain Res*, v. 504, n. 1, p. 139-41, 1989.

PETTEGREW, J. W. *et al.* . 31P-MRS study of acetyl-L-carnitine treatment in geriatric depression: preliminary results. *Bipolar Disord*, v. 4, n. 1, p. 61-6, 2002.

PING, F. *et al.* . 5-HT(1A) receptor and apoptosis contribute to interferon-alpha-induced "depressive-like" behavior in mice. *Neurosci Lett*, v. 514, n. 2, p. 173-8, 2012.

PITCHOT, W. *et al.* . [Recovering from depression: a matter of objective and determination]. *Rev Med Liege*, v. 65, n. 5-6, p. 370-80, 2010.

PLYTE, S. E. *et al.* . Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta*, v. 1114, n. 2-3, p. 147-62, 1992.

POLESZAK, E. *et al.* . NMDA/glutamate mechanism of magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. *Pharmacol Rep*, v. 60, n. 5, p. 655-63, 2008.

POOLE, A. W. *et al.* . PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*, v. 25, n. 10, p. 528-35, 2004.

POORTMANS, J. R.; FRANCAUX, M. Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Med Sci Sports Exerc*, v. 31, n. 8, p. 1108-10, 1999.

POPOLI, M. *et al.* . Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. *J Neurochem*, v. 74, n. 1, p. 21-33, 2000.

POPOLI, M.; GENNARELLI, M.; RACAGNI, G. Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disord*, v. 4, n. 3, p. 166-82, 2002.

POSSER, T. *et al.* . Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol*, v. 81, n. 6, p. 407-14, 2007.

POTTER, W. Z. *et al.* . Selective antidepressants and cerebrospinal fluid. Lack of specificity on norepinephrine and serotonin metabolites. Arch Gen Psychiatry, v. 42, n. 12, p. 1171-7, 1985.

PULIDO, S. M. *et al.* . Creatine supplementation improves intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and survival in mdx skeletal muscle cells. FEBS Lett, v. 439, n. 3, p. 357-62, 1998.

PULVIRENTI, G. *et al.* . Acetylcarnitine reduces the immobility of rats in a despair test (constrained swim). Behav Neural Biol, v. 54, n. 2, p. 110-4, 1990.

QUESADA, A. *et al.* . C-terminal mechano-growth factor induces heme oxygenase-1-mediated neuroprotection of SH-SY5Y cells via the protein kinase C/Nrf2 pathway. J Neurosci Res, v. 89, n. 3, p. 394-405, 2011.

RAHIMI, R. Creatine supplementation decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. J Strength Cond Res, v. 25, n. 12, p. 3448-55, 2011.

RAKPONGSIRI, K.; SAWANGKOON, S. Protective effect of creatine supplementation and estrogen replacement on cardiac reserve function and antioxidant reservation against oxidative stress in exercise-trained ovariectomized hamsters. Int Heart J, v. 49, n. 3, p. 343-54, 2008.

RAMBO, L. M. *et al.* . Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylenetetrazol-induced seizures. Amino Acids, v. 44, n. 3, p. 857-68, 2013.

RAMBO, L. M. *et al.* . Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. Neurochem Int, v. 55, n. 5, p. 333-40, 2009.

REALE, M. *et al.* . Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. Brain Behav Immun, v. 23, n. 1, p. 55-63, 2009.

REDROBE, J. P.; MACSWEENEY, C. P.; BOURIN, M. The role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, v. 318, n. 2-3, p. 213-20, 1996.

RENARD, C. E. *et al.* . Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Psychopharmacology (Berl)*, v. 159, n. 1, p. 42-50, 2001.

REUS, G. Z. *et al.* . Administration of harmine and imipramine alters creatine kinase and mitochondrial respiratory chain activities in the rat brain. *Depress Res Treat*, v. 2012, p. 987397, 2012a.

REUS, G. Z. *et al.* . Administration of memantine and imipramine alters mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain. *J Neural Transm*, v. 119, n. 4, p. 481-91, 2012b.

REZIN, G. T. *et al.* . Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int*, v. 53, n. 6-8, p. 395-400, 2008.

RHOADS, R. E. Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J Biol Chem*, v. 274, n. 43, p. 30337-40, 1999.

RICCI, L. C.; WELLMAN, M. M. Monoamines: biochemical markers of suicide? *J Clin Psychol*, v. 46, n. 1, p. 106-16, 1990.

RICHELSON, E. Interactions of antidepressants with neurotransmitter transporters and receptors and their clinical relevance. *J Clin Psychiatry*, v. 64 Suppl 13, p. 5-12, 2003.

RICHELSON E., PFENNING M. Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block

norepinephrine uptake. *Eur J Pharmacol*, v. 104, p. 277-86, 1984.

RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm*, v. 38, n. 3-4, p. 277-301, 1976.

RISCH, S. C.; NEMEROFF, C. B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J Clin Psychiatry*, v. 53 Suppl, p. 3-7, 1992.

ROBERTS, R.; GRACE, A. M. Purification of mitochondrial creatine kinase. Biochemical and immunological characterization. *J Biol Chem*, v. 255, n. 7, p. 2870-7, 1980.

RODRIGUES, A. L. *et al.* . Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci*, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.

RODRIGUES, A. L. *et al.* . Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol*, v. 79, n. 3, p. 150-6, 1996.

ROGOZ, Z. Potentiation of the antidepressant-like effect of desipramine or reboxetine by metyrapone in the forced swimming test in rats. *Pharmacol Rep*, v. 61, n. 6, p. 1173-8, 2009.

ROITMAN, S. *et al.* . Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study. *Bipolar Disord*, v. 9, n. 7, p. 754-8, 2007.

ROJO, A. I. *et al.* . Functional interference between glycogen synthase kinase-3 beta and the transcription factor Nrf2 in protection against kainate-induced hippocampal cell death. *Mol Cell Neurosci*, v. 39, n. 1, p. 125-32, 2008.

ROJO, A. I.; SAGARRA, M. R.; CUADRADO, A. GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant

damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem*, v. 105, n. 1, p. 192-202, 2008.

ROMERO, L.; HERVAS, I.; ARTIGAS, F. The 5-HT<sub>1A</sub> antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in rat brain. *Neurosci Lett*, v. 219, n. 2, p. 123-6, 1996.

ROMERO, T. R. *et al.* . Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth Analg*, v. 113, n. 5, p. 1254-9, 2011.

ROMMEL, C. *et al.* . Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*, v. 3, n. 11, p. 1009-13, 2001.

ROSA, A. O. *et al.* . Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, n. 6, p. 1549-56, 2008.

ROSSI, A. M. *et al.* . Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca<sup>2+</sup> uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem*, v. 265, n. 9, p. 5258-66, 1990.

ROYES, L. F. *et al.* . Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: role of NMDA receptors. *Neurochem Int*, v. 53, n. 1-2, p. 33-7, 2008.

ROYES, L. F. *et al.* . Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 83, n. 1, p. 136-44, 2006.

RUSH, A. J.; THASE, M. E.; DUBE, S. Research issues in the study of difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry*, v. 53, n. 8, p. 743-53, 2003.

SACHS, C.; JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol*, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1975.

SACKS, O. W. *et al.* . Side-effects of L-dopa in postencephalic parkinsonism. *Lancet*, v. 1, n. 7654, p. 1006, 1970a.

SACKS, O. W. *et al.* . Effects of L-dopa in patients with dementia. *Lancet*, v. 1, n. 7658, p. 1231, 1970b.

SACKS, O. W. *et al.* . Abnormal mouth-movements and oral damage associated with L-DOPA treatment. *Ann Dent*, v. 29, n. 4, p. 130-44, 1970c.

SAGI, Y. *et al.* . Activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway by rasagiline facilitates neurorescue and restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP-induced parkinsonism. *Neurobiol Dis*, v. 25, n. 1, p. 35-44, 2007.

SAKS, V. A.; KHUCHUA, Z. A.; KUZNETSOV, A. V. Specific inhibition of ATP-ADP translocase in cardiac mitoplasts by antibodies against mitochondrial creatine kinase. *Biochim Biophys Acta*, v. 891, n. 2, p. 138-44, 1987.

SAKS, V. A. *et al.* . Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem*, v. 133-134, p. 155-92, 1994.

SAKS, V. A. *et al.* . Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 56, n. 5, p. 691-706, 1978.

SALAZAR, M. *et al.* . Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem*, v. 281, n. 21, p. 14841-51, 2006.

SALTARELLI, M. D. *et al.* . Expression of the rat brain creatine transporter in situ and in transfected HeLa cells. *Dev Neurosci*, v. 18, n. 5-6, p. 524-34, 1996.

SANACORA, G. *et al.* . Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, n. 5, p. 426-37, 2008.

SANTOS, P. M. *et al.* . Brain creatine kinase activity is increased by chronic administration of paroxetine. *Brain Res Bull*, v. 80, n. 6, p. 327-30, 2009.

SANTOS, R. V. *et al.* . The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30km race. *Life Sci*, v. 75, n. 16, p. 1917-24, 2004.

SARAIVA, A. L. *et al.* . Creatine reduces oxidative stress markers but does not protect against seizure susceptibility after severe traumatic brain injury. *Brain Res Bull*, v. 87, n. 2-3, p. 180-6, 2012.

SARTINI, S. *et al.* . Creatine affects in vitro electrophysiological maturation of neuroblasts and protects them from oxidative stress. *J Neurosci Res*, v. 90, n. 2, p. 435-46, 2012.

SARTORIUS, A. *et al.* . Specific creatine rise in learned helplessness induced by electroconvulsive shock treatment. *Neuroreport*, v. 14, n. 17, p. 2199-201, 2003.

SAVAS, A. *et al.* . The effects of continuous and single-dose radiation on choline uptake in organotypic tissue slice cultures of rabbit hippocampus. *Neurol Res*, v. 23, n. 6, p. 669-75, 2001.

SAXENA, S. *et al.* . Differential brain metabolic predictors of response to paroxetine in obsessive-compulsive disorder versus major depression. *Am J Psychiatry*, v. 160, n. 3, p. 522-32, 2003.



SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, v. 19, n. 4, p. 2435-44, 1999.

SCHAPIRA, A. H. *et al.* . Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, v. 55, n. 6, p. 2142-5, 1990.

SCHEID, M. P.; MARIGNANI, P. A.; WOODGETT, J. R. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol*, v. 22, n. 17, p. 6247-60, 2002.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

SCHLATTNER, U.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta*, v. 1762, n. 2, p. 164-80, 2006.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol*, v. 18, n. 5-6, p. 391-418, 2007.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*, v. 318, n. 1, p. 215-24, 2004.

SCHULZ, J. B.; FALKENBURGER, B. H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, v. 318, n. 1, p. 135-47, 2004.

SEGAL, M. *et al.* . Serum creatine kinase level in unmedicated nonpsychotic, psychotic, bipolar and schizoaffective depressed patients. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 17, n. 3, p. 194-8, 2007.

SESTILI, P. *et al.* . Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts. *Mol Nutr Food Res*, v. 53, n. 9, p. 1187-204, 2009.

SESTILI, P. *et al.* . Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*, v. 40, n. 5, p. 837-49, 2006.

SESTILI, P. *et al.* . Creatine as an antioxidant. *Amino Acids*, v. 40, n. 5, p. 1385-96, 2011.

SHAH, P. C. *et al.* . Effect of *Withania somnifera* on forced swimming test induced immobility in mice and its interaction with various drugs. *Indian J Physiol Pharmacol*, v. 50, n. 4, p. 409-15, 2006.

SHAO, A.; HATHCOCK, J. N. Risk assessment for creatine monohydrate. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 45, n. 3, p. 242-51, 2006.

SHASTRY, B. S. Bipolar disorder: an update. *Neurochem Int*, v. 46, n. 4, p. 273-9, 2005.

SHELTON, R. C.; MAINER, D. H.; SULSER, F. cAMP-dependent protein kinase activity in major depression. *Am J Psychiatry*, v. 153, n. 8, p. 1037-42, 1996.

SHELTON, R. C. *et al.* . Cyclic AMP-dependent protein kinase in subtypes of major depression and normal volunteers. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 2, n. 3, p. 187-192, 1999.

SHOJAIEFARD, M.; CHRISTIE, D. L.; LANG, F. Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinase mTOR. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 341, n. 4, p. 945-9, 2006.

SIEBERT, A. *et al.* . Nrf2 activators provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in rat organotypic

nigrostriatal cocultures. *J Neurosci Res*, v. 87, n. 7, p. 1659-69, 2009.

SIGNORE, A. P. *et al.* . Erythropoietin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem*, v. 96, n. 2, p. 428-43, 2006.

SILVA, L. A. *et al.* . Creatine supplementation does not decrease oxidative stress and inflammation in skeletal muscle after eccentric exercise. *J Sports Sci*, v. 31, n. 11, p. 1164-76, 2013.

SILVERI, M. M. *et al.* . S-adenosyl-L-methionine: effects on brain bioenergetic status and transverse relaxation time in healthy subjects. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 8, p. 833-9, 2003.

SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev*, v. 54, n. 2, p. 233-50, 2007.

SKALISZ, L. L. *et al.* . Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 26, n. 5, p. 879-83, 2002.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol*, v. 375, n. 1-3, p. 31-40, 1999.

SLEATH, B.; WURST, K.; LOWERY, T. Drug information sources and antidepressant adherence. *Community Ment Health J*, v. 39, n. 4, p. 359-68, 2003.

SMELAND, O. B. *et al.* . Chronic acetyl-L-carnitine alters brain energy metabolism and increases noradrenaline and serotonin content in healthy mice. *Neurochem Int*, v. 61, n. 1, p. 100-7, 2012.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, v. 35, n. 4, p. 298-306, 1991.

SNOW, R. J.; MURPHY, R. M. Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol Cell Biochem*, v. 224, n. 1-2, p. 169-81, 2001.

SONG, B. *et al.* . Inhibitory phosphorylation of GSK-3 by CaMKII couples depolarization to neuronal survival. *J Biol Chem*, v. 285, n. 52, p. 41122-34, 2010.

SORA, I.; NISHIMON, K.; OTSUKI, S. Dexamethasone suppression test and noradrenergic function in affective and schizophrenic disorders. *Biol Psychiatry*, v. 21, n. 7, p. 621-31, 1986.

SORA, I. *et al.* . The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 204, n. 1, p. 419-27, 1994.

SOTO-OTERO, R. *et al.* . Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*, v. 74, n. 4, p. 1605-12, 2000.

SOUZA, M. A. *et al.* . Involvement of hippocampal CAMKII/CREB signaling in the spatial memory retention induced by creatine. *Amino Acids*, v. 43, n. 6, p. 2491-503, 2012.

SPIACCI, A., JR. *et al.* . Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 88, n. 3, p. 247-55, 2008.

SPIEGEL, D. Cancer and depression. *Br J Psychiatry Suppl*, n. 30, p. 109-16, 1996.

STAHL, S. 5HT1A receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? *Psychopharmacol Bull*, v. 30, n. 1, p. 39-43, 1994.

STAHL, S. M. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord*, v. 51, n. 3, p. 215-35, 1998.

\_\_\_\_\_. Blue genes and the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry*, v. 61, n. 2, p. 77-8, 2000.

STARKSTEIN, S. E. *et al.* . Depression and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain*, v. 112 ( Pt 5), p. 1141-53, 1989.

STERU, L. *et al.* . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STOOF, J. C. *et al.* . Leads for the development of neuroprotective treatment in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. *Eur J Pharmacol*, v. 375, n. 1-3, p. 75-86, 1999.

STOPPINI, L.; BUCHS, P. A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, v. 37, n. 2, p. 173-82, 1991.

STRAKOWSKI, S. M. Bioenergetics for depression: something different for depression. *Am J Psychiatry*, v. 169, n. 9, p. 891-3, 2012.

STRITTMATTER, F. *et al.* . Activation of protein kinase B/Akt by alpha1-adrenoceptors in the human prostate. *Life Sci*, v. 90, n. 11-12, p. 446-53, 2012.

SUBRAMANIAN, A.; MILLER, D. M. Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem*, v. 275, n. 8, p. 5958-65, 2000.

SUI, L.; WANG, J.; LI, B. M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling

pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem*, v. 15, n. 10, p. 762-76, 2008.

SULLIVAN, P. G. *et al.* . Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann Neurol*, v. 48, n. 5, p. 723-9, 2000.

SUMITANI, S. *et al.* . Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology*, v. 143, n. 3, p. 820-8, 2002.

SUN, M. K.; ALKON, D. L. Protein kinase C isozymes: memory therapeutic potential. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, v. 4, n. 5, p. 541-52, 2005.

SUZUKI, E. *et al.* . Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord*, v. 63, n. 1-3, p. 221-4, 2001.

SUZUKI, K. *et al.* . Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS One*, v. 5, n. 2, p. e9260, 2010.

SVENSSON, T. H. Central alpha-adrenoceptors and the mechanisms of action of antidepressant drugs. *Adv Biochem Psychopharmacol*, v. 39, p. 241-8, 1984.

SZEWCZYK, B. *et al.* . The involvement of NMDA and AMPA receptors in the mechanism of antidepressant-like action of zinc in the forced swim test. *Amino Acids*, v. 39, n. 1, p. 205-17, 2010.

TACHIKAWA, M. *et al.* . Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glial relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci*, v. 20, n. 1, p. 144-60, 2004.

TACHIKAWA, M. *et al.* . A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers,

creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. *Subcell Biochem*, v. 46, p. 83-98, 2007.

TADAIESKY, M. T. *et al.* . Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, v. 156, n. 4, p. 830-40, 2008.

TANDA, G. *et al.* . Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology (Berl)*, v. 115, n. 1-2, p. 285-8, 1994.

TANNER CM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, v. 10, n. 2, p. 317-29, 1992.

TATARCZYNSKA, E., KLODZINSKA, A., CHOJNACKA-WOJCIK, E. Effects of combined administration of 5-HT<sub>1A</sub> and/or 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonists and paroxetine or fluoxetine in the forced swimming test in rats. *Pol J Pharmacol*, v. 54, p. 615-623, 2002.

TAYLOR, C. *et al.* . Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal*, v. 17, n. 5, p. 549-57, 2005.

TEISMANN, P. *et al.* . Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 18, n. 2, p. 121-9, 2003.

TEIXEIRA, M. A. R. Melancolia e depressão: um resgate histórico e conceitual na psicanálise e na psiquiatria. *Revista de Psicologia da UNESP*, v. 4, n. 1, 2005.

TERADA, Y. *et al.* . Sequential activation of Raf-1 kinase, mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, MAP kinase, and S6 kinase by hyperosmolality in renal cells. *J Biol Chem*, v. 269, n. 49, p. 31296-301, 1994.

TESTE, J. F.; MARTIN, I.; RINJARD, P. Electrotherapy in mice: dopaminergic and noradrenergic effects in the Tail

Suspension Test. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 4, n. 1, p. 39-47, 1990.

TETER, B. *et al.* . Human apolipoprotein E isoform-specific differences in neuronal sprouting in organotypic hippocampal culture. *J Neurochem*, v. 73, n. 6, p. 2613-6, 1999.

TIAN, L. L. *et al.* . Protective effect of (+/-) isoborneol against 6-OHDA-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Cell Physiol Biochem*, v. 20, n. 6, p. 1019-32, 2007.

TIONG, C. X.; LU, M.; BIAN, J. S. Protective effect of hydrogen sulphide against 6-OHDA-induced cell injury in SH-SY5Y cells involves PKC/PI3K/Akt pathway. *Br J Pharmacol*, v. 161, n. 2, p. 467-80, 2010.

TIRMENSTEIN, M. A. *et al.* . Effects of 6-hydroxydopamine on mitochondrial function and glutathione status in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro*, v. 19, n. 4, p. 471-9, 2005.

TOKITA, K.; YAMAJI, T.; HASHIMOTO, K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 100, n. 4, p. 688-704, 2012.

TORRES, G. E.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 1, p. 13-25, 2003.

TRZECIAK, H. I. *et al.* . Effect of antidepressants on ATP content, 3H-valine incorporation and cell morphometry of astrocytes cultured from rat brain. *Dev Neurosci*, v. 17, n. 5-6, p. 292-9, 1995.

TUGLU, C. *et al.* . Increased serum tumor necrosis factor- $\alpha$  levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 170, n. 4, p. 429-33, 2003.



VAN DE KAMP, J.M, *et al.* . New insights into creatine transporter deficiency: the importance of recycling creatine in the brain. *J Inherit Metab Dis*, v. 36, n. 1, p. 155-6, 2013.

VAN PILSUM, J. F.; STEPHENS, G. C.; TAYLOR, D. Distribution of creatine, guanidinoacetate and the enzymes for their biosynthesis in the animal kingdom. Implications for phylogeny. *Biochem J*, v. 126, n. 2, p. 325-45, 1972.

VENKATRAMAN, T. N. *et al.* . Biochemical abnormalities of the medial temporal lobe and medial prefrontal cortex in late-life depression. *Psychiatry Res*, v. 172, n. 1, p. 49-54, 2009.

VERHEIJ, M. M.; COOLS, A. R. Differential contribution of storage pools to the extracellular amount of accumbal dopamine in high and low responders to novelty: effects of reserpine. *J Neurochem*, v. 100, n. 3, p. 810-21, 2007.

VERWER, R. W. *et al.* . Tissue cultures from adult human postmortem subcortical brain areas. *J Cell Mol Med*, v. 6, n. 3, p. 429-32, 2002.

VETULANI, J. *et al.* . Alpha up-beta down adrenergic regulation: a possible mechanism of action of antidepressant treatments. *Pol J Pharmacol Pharm*, v. 36, n. 2-3, p. 231-48, 1984.

VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. *Eur J Pharmacol*, v. 405, n. 1-3, p. 351-63, 2000.

VIEIRA, K. F. L. Depressão e suicídio: uma abordagem psicossomática no contexto acadêmico. Dissertação (Mestrado em Psicologia Social) – Centro de Ciências Humanas, Artes e Letras, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

VILA, M. *et al.* . The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, v. 14, n. 4, p. 483-9, 2001.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 5, p. 365-75, 2003.

VLAHOS, C. J. *et al.* . A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, v. 269, n. 7, p. 5241-8, 1994.

VOLZ, H. P. *et al.* . <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in the frontal lobe of major depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, v. 248, n. 6, p. 289-95, 1998.

VUCKOVIC, M. G. *et al.* . Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Neurobiol Dis*, v. 32, n. 2, p. 319-27, 2008.

WAEHRENS, J.; GERLACH, J. Bromocriptine and imipramine in endogenous depression. A double-blind controlled trial in out-patients. *J Affect Disord*, v. 3, n. 2, p. 193-202, 1981.

WALKER, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, v. 50, p. 177-242, 1979.

WALLIMANN, T.; HEMMER, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem*, v. 133-134, p. 193-220, 1994.

WALLIMANN, T.; SCHLOSSER, T.; EPPENBERGER, H. M. Function of M-line-bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle. *J Biol Chem*, v. 259, n. 8, p. 5238-46, 1984.

WALLIMANN, T.; ZURBRIGGEN, B.; EPPENBERGER, H. M. Separation of mitochondrial creatine kinase (MiMi-CK) from cytosolic creatine kinase isoenzymes by Cibachrome-Blue affinity chromatography. *Enzyme*, v. 33, n. 4, p. 226-31, 1985.

WALSH, K.; MEGYESI, J.; HAMMOND, R. Human central nervous system tissue culture: a historical review and examination of recent advances. *Neurobiol Dis*, v. 18, n. 1, p. 2-18, 2005.

WANG, D.; MALER, L. Differential roles of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinases in posttetanic potentiation at input selective glutamatergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 12, p. 7133-8, 1998.

WANG, W. *et al.* . Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity. *Neuropharmacology*, v. 52, n. 8, p. 1678-84, 2007.

WASCHER, T. C. *et al.* . Vascular effects of L-arginine: anything beyond a substrate for the NO-synthase? *Biochem Biophys Res Commun*, v. 234, n. 1, p. 35-8, 1997.

WEGENER, G. *et al.* . Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res*, v. 959, n. 1, p. 128-34, 2003.

WEGMANN, G. *et al.* . Differential expression and localization of brain-type and mitochondrial creatine kinase isoenzymes during development of the chicken retina: Mi-CK as a marker for differentiation of photoreceptor cells. *Differentiation*, v. 46, n. 2, p. 77-87, 1991.

WEI, Y. *et al.* . Dopamine transporter activity mediates amphetamine-induced inhibition of Akt through a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, v. 71, n. 3, p. 835-42, 2007.

WENG, Z. *et al.* . Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, v. 282, n. 47, p. 34479-91, 2007.

WENGER, W. C. *et al.* . Effects of ionic strength and sulfhydryl reagents on the binding of creatine phosphokinase to

heart mitochondrial inner membranes. *J Bioenerg Biomembr*, v. 17, n. 5, p. 295-303, 1985.

WILKEN, B. *et al.* . Creatine protects the central respiratory network of mammals under anoxic conditions. *Pediatr Res*, v. 43, n. 1, p. 8-14, 1998.

WILLIAMS, M.H. *et al.* . Creatine: The power supplement. Human Kinetics Publishers, 1999.

WILLIAMS, J. R.; CASERO, R. A.; DILLEHAY, L. E. The effect of polyamine depletion on the cytotoxic response to PUVA, gamma rays and UVC in V79 cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 201, n. 1, p. 1-7, 1994.

WITTCHEN, H. U.; KNAUPER, B.; KESSLER, R. C. Lifetime risk of depression. *Br J Psychiatry Suppl*, n. 26, p. 16-22, 1994.

WOLF, S. A. *et al.* . Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. *Glia*, v. 36, n. 3, p. 414-20, 2001.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, n. 5, p. 343-51, 2001.

WOODGETT, J. R. Physiological roles of glycogen synthase kinase-3: potential as a therapeutic target for diabetes and other disorders. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, v. 3, n. 4, p. 281-90, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report - Mental Health: New Understanding, New Hope, 2009.

WRUCK, C. J. *et al.* . Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP<sup>+</sup> induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J Neural Transm Suppl*, n. 72, p. 57-67, 2007.

WU, G.; MEININGER, C. J. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr*, v. 130, n. 11, p. 2626-9, 2000.

WU, J. *et al.* . NOx- concentrations in the rat hippocampus and striatum have no direct relationship to anaesthesia induced by ketamine. *Br J Anaesth*, v. 84, n. 2, p. 183-9, 2000.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, v. 80, n. 3, p. 1107-213, 2000.

XIANG, Z. *et al.* . Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro. *J Neurosci Methods*, v. 98, n. 2, p. 145-54, 2000.

XU, C. J. *et al.* . Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. A comparison with atp-dependent glutamate uptake. *J Biol Chem*, v. 271, n. 23, p. 13435-40, 1996.

XU, K. *et al.* . Glial fibrillary acidic protein is necessary for mature astrocytes to react to beta-amyloid. *Glia*, v. 25, n. 4, p. 390-403, 1999.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, v. 504, n. 3, p. 207-11, 2004.

YAN, Z. *et al.* . D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 20, p. 11607-12, 1999.

YANG, L. *et al.* . Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. *J Neurochem*, v. 109, n. 5, p. 1427-39, 2009.

YANG, M. *et al.* . Triptolide overcomes dexamethasone resistance and enhanced PS-341-induced apoptosis via

PI3k/Akt/NF-kappaB pathways in human multiple myeloma cells. *Int J Mol Med*, v. 22, n. 4, p. 489-96, 2008.

YANG, W. C.; DUBICK, M. Inhibition of cardiac creatine phosphokinase by fluorodinitrobenzene. *Life Sci*, v. 21, n. 8, p. 1171-7, 1977.

YANG, Y. *et al.* . Proteomics reveals energy and glutathione metabolic dysregulation in the prefrontal cortex of a rat model of depression. *Neuroscience*, v. 247C, p. 191-200, 2013.

YI, L. T. *et al.* . Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of nobiletin. *Physiol Behav*, v. 102, n. 1, p. 1-6, 2011.

YONG-KEE, C. J.; SALOMONCZYK, D.; NASH, J. E. Development and validation of a screening assay for the evaluation of putative neuroprotective agents in the treatment of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, v. 19, n. 4, p. 519-26, 2011.

YONG, Y. *et al.* . Lithium fails to protect dopaminergic neurons in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*, v. 36, n. 3, p. 367-74, 2011.

YOUNG, T.L. Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. *J Psychiatry Neurosci*, v.27, n. 1: p. 8-9, 2002.

YOUNG, J. F. *et al.* . Creatine-induced activation of antioxidative defence in myotube cultures revealed by explorative NMR-based metabolomics and proteomics. *J Int Soc Sports Nutr*, v. 7, n. 1, p. 9, 2010.

YUAN, T. T. *et al.* . [Activation of hippocampal D1 dopamine receptor inhibits glutamate-mediated depression induced by chronic unpredictable mild stress in rats]. *Sheng Li Xue Bao*, v. 63, n. 4, p. 333-41, 2011.

ZAHODNE, L. B. *et al.* . Components of depression in Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, v. 25, n. 3, p. 131-7, 2012.

ZENI, A. L. *et al.* . Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *J Ethnopharmacol*, v. 137, n. 1, p. 864-74, 2011.

ZENI, A. L. *et al.* . Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 103, n. 2, p. 181-6, 2012.

ZHANG, W. P.; OUYANG, M.; THOMAS, S. A. Potency of catecholamines and other L-tyrosine derivatives at the cloned mouse adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, v. 47, n. 3, p. 438-49, 2004.

ZHANG, Z. *et al.* . Baicalein protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity through activation of Keap1/Nrf2/HO-1 and involving PKC $\alpha$  and PI3K/AKT signaling pathways. *J Agric Food Chem*, v. 60, n. 33, p. 8171-82, 2012.

ZOMKOWSKI, A. D. *et al.* . The role of the NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 103, n. 2, p. 408-17, 2012.

ZOMKOWSKI, A. D. *et al.* . Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 20, n. 11, p. 793-801, 2010.

ZUCCHI, R. *et al.* . Protection of isolated rat heart from oxidative stress by exogenous creatine phosphate. *J Mol Cell Cardiol*, v. 21, n. 1, p. 67-73, 1989.